

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12N 15/12, 15/63, 15/67 C12N 15/85, C07K 13/00 A61K 37/02	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/05785 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. März 1994 (17.03.94)
--	-----------	---

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/02294 (22) Internationales Anmeldedatum: 26. August 1993 (26.08.93) (30) Prioritätsdaten: P 42 28 458.9 27. August 1992 (27.08.92) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BEI-ERSDORF AG [DE/DE]; Unnastraße 48, D-20253 Hamburg (DE). GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : DIRKS, Wilhelm [DE/DE]; Büldenweg 13, D-38106 Braunschweig (DE). WIRTH, Manfred [DE/DE]; Marktstraße 1, D-38300 Wolfenbüttel (DE). HAUSER, Hansjörg [DE/DE]; Georg-Westermannallee 29, D-38104 Braunschweig (DE). EICHNER, Wolfram [DE/DE]; Dorotheenstraße 49, D-22301 Hamburg (DE). ACHTERBERG, Volker [DE/DE]; Eimsbütteler Marktplatz 11, D-20257 Hamburg (DE). DÖRSCHNER, Albrecht [DE/DE]; Schanzenstraße 107, D-20357 Hamburg (DE). MEYER-INGOLD, Wolfgang [DE/DE]; Am Hasenkamp 29, D-22457 Hamburg (DE). MIELKE, Heiko [DE/DE]; Fischbeker Straße 22, D-21629 Neu Wulmstorf (DE).	(74) Anwälte: VOELKER, Ingeborg usw. ; Uexküll & Stolberg, Beselerstr. 4, D-22607 Hamburg (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, HU, JP, KZ, PL, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
---	---

(54) Title: MULTICISTRONIC EXPRESSION UNITS AND THEIR USE

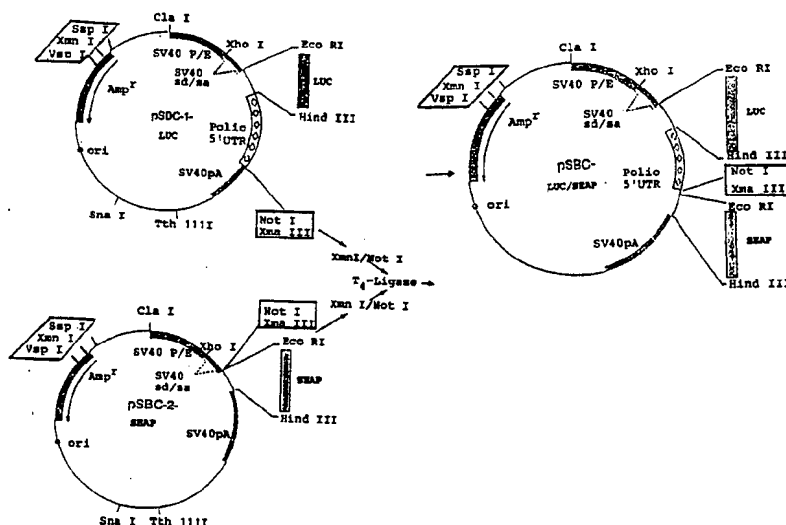
(54) Bezeichnung: MULTICISTRONISCHE EXPRESSIONSEINHEITEN UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract

Multicistronic expression units allow the equimolar expression of the genes located in the corresponding cistrons. These expression units are particularly suitable for the recombinant production of proteins composed of two or more polypeptide subunits.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft multicistronische Expressionseinheiten, welche die äquimolare Expression der in den jeweiligen Cistrons positionierten Gene zulassen. Die Expressionseinheiten sind insbesondere geeignet zur rekombinanten Herstellung von Proteinen, welche aus zwei oder mehreren Polypeptid-Untereinheiten bestehen.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NE	Niger
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IE	Irland	PT	Portugal
BY	Belarus	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CJ	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SK	Slowakische Republik
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TC	Togo
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	UA	Ukraine
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	ML	Mali	UZ	Usbekistan
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Multicistronische Expressionseinheiten und deren Verwendung

Die Erfindung betrifft multicistronische Expressionseinheiten und deren Verwendung zur äquimolaren Expression von Polypeptiden oder Untereinheiten derselben in Säugerzellen als Wirtszellen.

Es ist bereits seit langem möglich, einzelne Proteine, deren Gene durch Klonierung isoliert wurden, nach Manipulation und Gentransfer in verschiedenen prokaryontischen und eukaryontischen Zellen herzustellen. Für das Erreichen der vollen biologischen Aktivität vieler Proteine sind korrekte Faltungen, richtiges Prozessieren und gegebenenfalls auch posttranslationale Modifikationen erforderlich, welche in prokaryontischen und niederen eukaryontischen Expressionssystemen oftmals nicht korrekt ausgeführt werden. Aus diesem Grund bedient man sich häufig Säugerzellen als Wirte. Säugerzellen sind darüber hinaus in der Lage, große Mengen von Proteinen zu sekretieren.

- 2 -

Aus den verschiedensten Gründen bedarf es oftmals der simultanen Herstellung zweier oder mehrerer Proteinketten. Zum Beispiel sind viele natürliche Proteine in ihrer funktionellen Form aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt (z.B. Antikörper). Natürlichlicherweise erfolgt die Assoziation verschiedener Untereinheiten von komplexen Proteinen nach der Proteinsynthese. An dieser Assoziation sind häufig andere Komponenten des zellulären Apparates als Katalysatoren oder Kontrollelemente beteiligt, wobei es gelegentlich auch zu Umfaltungen der ursprünglichen Strukturen kommt. Störungen der Assoziation, z.B. durch ungleiche Synthese der einzelnen Komponenten, können sowohl für die zu bildenden Proteine als auch für die Wirtszelle negative Konsequenzen haben. Natürlichlicherweise unterliegt dieses System einer ausgefeilten, meist zellspezifischen Regulation. Da diese Regulation in genetisch manipulierten Zellen im allgemeinen nicht nachstellbar ist, wurden die nachfolgend erläuterten Alternativen zur simultanen Herstellung mehrerer Fremdproteine entwickelt und angewandt:

- 1) Die Gene werden getrennt in Expressionsvektoren integriert und dann in einem geeigneten Verhältnis in die Zellen cotransferiert. Dies setzt voraus, daß mehrere Plasmidkopien gleichzeitig stabil aufgenommen und bei der Teilung weitergetragen werden. Das Verhältnis der Expression der verschiedenen Gene zueinander hängt sowohl von der Kopienzahl als auch von der Integrationsstelle im Genom der Wirtszelle ab. Durch aufwendige Screeningverfahren ist es möglich, Zellklone zu isolieren, welche die einzelnen Genprodukte im gewünschten Verhältnis zueinander exprimieren.
- 2) Um die Kopienzahl zu nivellieren, werden die verschiedenen Gene in unabhängigen Transkriptionseinheiten auf einem Vektor plaziert. Dies sichert weitgehend die stöchiometrische Repräsentanz der Gene, aber auch dieses Verfahren ist mit Problemen behaftet. Selbst wenn nämlich Expressionseinheiten mit Promotoren gleicher Stärke verwendet werden, ist

keineswegs sichergestellt, daß die mRNAs, welche für die verschiedenen Proteine kodieren, die gleiche Stabilität und Translationseffizienz aufweisen. Auch die Transkriptionseffizienz beider Gene muß nicht zwangsläufig identisch sein. In diesem Fall wird mit Hilfe von gentechnischen Tricks (Positionierung der Transkriptionseinheiten zueinander, Modulation der Stärke der einzelnen Promotoren durch Wegnehmen oder Hinzufügen einzelner Elemente) die Stöchiometrie der Expression schrittweise hergestellt.

- 3) Zur Vermeidung der Probleme im Zusammenhang mit der Stabilität der mRNA verschiedener Transkripte wurden bi- oder multicistronische Vektoren entwickelt. Hierzu liegen die einzelnen Leseraster der die Proteinketten kodierenden Genabschnitte - Cistrons - auf einer Transkriptionseinheit (Expressionseinheit). Die Expression des multicistronischen Gens erfolgt durch einen einzigen Promotor. Bei derartigen Vektoren wird normalerweise das erste Cistron sehr effizient translatiert, die nachfolgenden aber in Abhängigkeit von den intercistronischen Sequenzen. Verwendet man für diese intercistronischen Sequenzen normale 5' nicht translatierte Sequenzen (5'UTR) aus monocistronischen Genen, so ist die Expression des nachfolgenden Cistrons meist sehr niedrig (in der Regel um 0,5 bis 2% der Translation des ersten Cistrons, Kaufman et al., 1987; Boel et al., 1987). Diese Effizienz konnte zunächst durch Einfügen von Leadersequenzen (High Efficiency Leaders, HEL) auf etwa 20% gesteigert werden. Mit der Entdeckung und Verwendung von bestimmten zellulären und viralen Sequenzen, welche eine interne Translationsinitiation ermöglichen (IRES; Jackson et al., 1990) war es möglich, ein Translationsverhältnis zwischen dem ersten und dem nachfolgenden Cistron von 3:1 zu erzielen.

Die Schlüsselrolle bei der Verwendung bi- oder multicistronischer Vektoren spielt die Translation. Normalerweise erfolgt die

Initiation der Translation in Eukaryonten nach dem "cap"-abhängigen Mechanismus, im Verlaufe dessen ein Prä-Initiationskomplex aus Proteinen und RNA am 5'Ende einer mRNA mit "cap" (methyliertes Nukleotid) aufgebaut wird. Von dort aus wird ein geeignetes
5 Translationsinitiationskodon ausgesucht, von dem ausgehend die Translation gestartet wird. Man glaubt, daß dies über einen "Scanning"-Prozeß abläuft, wobei sich der Prä-Initiationskomplex entlang der mRNA in 3'Richtung bewegt. Auf diese Weise wird, von einigen Ausnahmen abgesehen, immer das am 5'Ende liegende Cistron effizient translatiert (Kozak, 1989). Alle nachfolgenden
10 Cistrons werden gar nicht oder sehr ineffizient translatiert. Die Translations-Effizienz der nachfolgenden Cistrons konnte durch Optimierung des Abstandes zwischen den Genen (intercistronische Regionen; Kozak, 1987; Wirth et al., 1991) oder durch
15 Verwendung von sogenannten "high efficiency leader"-Sequenzen (HEL, s.o.) verbessert werden (z.B. Falcone und Andrews, 1991 und Ref. darin). HEL's sind solche 5'nicht translatierten Bereiche von Genen oder auch anderen Sequenzen, welche die Initiation der "cap"-abhängigen Translation stimulieren. Auch bei
20 derartigen Konstrukten sind jedoch die erreichbaren Expressionswerte für das zweite und die nachfolgenden Cistrons immer deutlich geringer als die des "cap"-abhängig regulierten ersten Cistrons.

25 Ein in den letzten Jahren aufgedeckter Mechanismus zur internen Translationsinitiation, d.h. der Start der Translation an einer mRNA ohne "cap"-Struktur, benutzt spezifische Nukleinsäuresequenzen. Zu diesen Sequenzen zählen die nicht translatierten Bereiche einzelner Picorna-Viren, z.B. Polio-Virus, Encephalo-
30 myocarditis-Virus, (Pelletier und Sonenberg, 1988; Jang et al., 1988; Jang et al., 1989) sowie einiger zellulärer Proteine, z.B. BiP (Macejak und Sarnow, 1991). Bei den Picorna-Viren sorgt ein kurzer Abschnitt des 5'nicht translatierten Bereichs, das sogenannte IRES (internal ribosomal entry site), für die interne
35 Bindung eines Prä-Initiationskomplexes. Ein Bereich von 628 nt ist im Fall des Poliovirus Typ 1 für die effiziente Initiation

dieser Translation notwendig. Untersuchungen zeigten, daß für eine effiziente Translation nicht nur die 400 Basenpaare des 3'-Bereiches von IRES, sondern auch der extreme 5'Teil des Poliovirus nicht-translatierten Region notwendig ist (Simoes und Sarnow, 1991). Auf der anderen Seite führt das "capping", die Voraussetzung für den normalen Initiationsmechanismus der Translation, zu einer Reduktion der Effizienz der internen Initiation von Polio-Virus IRES, wenn er am 5'Ende einer entsprechenden mRNA lokalisiert ist (Hambidge und Sarnow, 1991). Der negative Effekt wird aufgehoben, wenn die IRES für die Initiation des zweiten Cistrons verantwortlich ist, also zwischen "cap" und IRES ein Cistron liegt.

IRES-Elemente können also als Initiatoren für die effiziente Translation von Leserastern fungieren. Dabei beeinflussen sie die "cap"-abhängige Translation des ersten Cistrons nicht. Auch umgekehrt scheint eine Beeinflussung der IRES-abhängigen Initiation unabhängig von der "cap"-abhängigen Translationsinitiation zu sein. Die Mechanismen beider Vorgänge unterscheiden sich auch deutlich in der Verwendung verschiedener zellulärer Faktoren (Meerovitch et al., 1989; Jang und Wimmer, 1990). In der vergangenen Zeit wurden mehrere Untersuchungen publiziert, bei denen bicistronische Expressionsplasmide verwendet wurden (Adam et al., 1991; Ghattas et al., 1991; Kaufman et al., 1991; Wood et al., 1991; Wirth et al., 1991). Da aber offensichtlich die "cap"-abhängige Translation stärker ist als die IRES-abhängige Translation, konnte eine stöchiometrische Expression zweier Proteinketten nicht erreicht werden. Die bisherigen Verwendungen konzentrierten sich deshalb auf die Verwendung von Selektionsmarkern im zweiten Cistron. Die enge Expressionskoppelung des Selektionsmarkers mit dem zu exprimierenden Gen, welches das erste Cistron darstellt, ist besonders vorteilhaft bei der Selektion auf Hochexpression, insbesondere, wenn eine vorausgehende Genamplifikation erforderlich ist. Die Synthese äquimolarer Proteinmengen von bi- oder multicistronischen Expressionsvektoren ist jedoch bisher nicht erreicht worden.

Ein typisches Beispiel für die Bedeutung, welche der äquimolaren Expression zweier verschiedener Proteinketten in rekombinanten Herstellungsverfahren zukommen kann, ist die gentechnologische Gewinnung des Wachstumsfaktors aus Blutplättchen, "Platelet-Derived-Growth-Factor" (PDGF), einem der Hauptmitogene im menschlichen Blutserum. Aus menschlichen Thrombozyten aufgereinigtes PDGF besteht aus zwei unterschiedlichen, aber nahe verwandten Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Unter reduzierenden Bedingungen zerfällt das dimere PDGF in seine monomeren Untereinheiten, wovon die größere (M_r 15-17.000 D) als PDGF-A-Kette und die kleinere (M_r 14.000 D) als PDGF-B-Kette bezeichnet wird (Johnsson et al., 1984).

Die Proteinketten PDGF-A und -B werden von verschiedenen Genen kodiert. Die vollständige Struktur beider Genprodukte konnte durch cDNA-Klonierung aufgeklärt werden (Ratner et al., 1985, Betsholtz et al., 1986). Dabei zeigte es sich, daß beide PDGF-Moleküle zunächst als ungewöhnlich lange Vorläufermoleküle, sog. Precursoren, synthetisiert und anschließend intrazellulär zu den reifen PDGF-Ketten prozessiert werden. Durch alternatives Spleißen lassen sich zwei verschiedene PDGF-A-Transkripte erklären, die sich durch An- oder Abwesenheit eines 69-bp Segmentes im 3'-Bereich unterscheiden (Betsholtz et al., 1986; Wise et al., 1989). Durch dieses Insert kommt es zu einer Änderung im codierenden Abschnitt mit der Folge, daß eine kurze (PDGF-A_K, 110 Aminosäuren) und eine lange (PDGF-A_L, 125 Aminosäuren) Form der PDGF-A-Kette gebildet wird. Beide Varianten sind als normale zelluläre Proteine nebeneinander nachweisbar, wobei die kürzere Form die häufigere Spezies ist (Matoskova et al., 1989; Young et al., 1990).

Beide Gene sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert und zeigen einen hohen Homologiegrad. Eine Vielzahl von Arbeiten zeigt, daß beide Gene unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen. Eine Folge davon ist, daß beide PDGF-Ketten natür-

licherweise in verschiedenen Zelltypen in unterschiedlichem Verhältnis zueinander produziert werden.

Alle drei möglichen Isoformen des PDGF (AA, AB und BB) kommen
5 natürlicherweise vor und sind in Thrombozyten in sogenannten α -Granula gespeichert. Aus überlagerten menschlichen Blutplättchen kann neben dem die Hauptmenge bildenden PDGF-AB Heterodimer auch PDGF-BB zu etwa 30 % isoliert werden (Hammacher et al., 1988). Frisch präparierte Blutplättchen enthalten auch einen
10 hohen Anteil (27%) an PDGF-AA (Hart et al., 1990). Es kann daher angenommen werden, daß in den Vorläuferzellen der Thrombozyten, den Megakaryozyten, der Anteil beider Homodimere zusammen etwa dem AB-Heterodimer-Anteil entspricht. Da die Konzentration jeder PDGF-Spezies im Thrombozyten direkt korrelieren sollte mit ihrer
15 individuellen Bedeutung im Wundheilungsgeschehen, kommt insbesondere der häufigsten Isoform, dem PDGF-AB, eine herausragende Bedeutung auf der Suche nach einem "Wundheilungshormon" zu.

Jede der verschiedenen Isoformen besitzt biologische Aktivität
20 *in vitro*. Erst die Verfügbarkeit der hochreinen, rekombinanten PDGF-Isoformen (Hoppe et al., 1989; Hoppe et al., 1990) machte vergleichende Studien zur Differenzierung der unterschiedlichen Wirkungsspektren der verschiedenen PDGF-Spezies möglich. Inzwischen belegen eine Reihe von Untersuchungen die unterschiedliche
25 Potenz von PDGF-AA, AB und BB im Chemotaxis- und DNA-Proliferations-test (Hosang et al., 1989; Nister et al., 1988; Reilly & Broski, 1989; Siegbahn et al., 1990), sowie deren unterschiedlichen Einfluß auf die Freisetzung von Inositol-1,4,5-trisphosphat, Produktion von Diacylglycerol und $[Ca^{2+}]_i$ -Mobilisierung
30 (Block et al., 1989; Sachinidis et al., 1990 A, 1990 B). Zwei unterschiedliche PDGF-Rezeptorpopulationen, von denen der PDGF- α -Rezeptor alle PDGF-Isoformen und der β -Rezeptor nur PDGF-BB bindet (Hart et al., 1988; Heldin et al., 1988) liefern eine plausible Erklärung dafür, wie sich Wirkungsunterschiede der
35 PDGF-Isoformen über deren unterschiedliche Potenz zur Rezeptoraktivierung entfalten können. Die meßbaren unterschiedlichen *in*

vitro-Effekte der PDGF-Isoformen, zusammen mit dem Nachweis zweier verschiedenener Rezeptorpopulationen, lassen Rückschlüsse auf unterschiedliche *in vivo* Wirkungsspektren von PDGF-AA, AB und BB zu. Daher ist die Produktion von reinem PDGF-AB, ohne
5 PDGF-BB oder PDGF-AA als Begleitproteine, wünschenswert. Um ein homogenes, gut charakterisiertes Heterodimer zu erhalten, müßten die Homodimere sonst durch Reinigung vollständig eliminiert werden, was durch die sehr ähnlichen chromatographischen Eigenschaften aller PDGF Spezies zusätzlich erschwert wird.

10

Eine Reihe verschiedener Wege zur Herstellung von rekombinanten PDGF-Homodimeren, insbesondere PDGF-BB, sind zum Teil schon seit längerer Zeit bekannt (Kelly et al., 1985; Heldin et al., 1986; Hoppe et al., 1989; Beckmann et al., 1988; Bywater et al., 1988;
15 Stroobant & Waterfield 1984). Ein Herstellungsverfahren für hochreines PDGF-AB wurde von Hoppe et al. (1990, s.a. PCT/EP 90/00 063) beschrieben. Hier werden die getrennt in unterschiedlichen *E. coli*-Zellen hergestellten, inaktiven Monomere durch *in vitro*-Renaturierung in biologisch aktives PDGF-AB überführt.

20

Die bislang synthetisierten Genprodukte der drei PDGF-Isoformen weisen, trotz variierender Länge der A- bzw. B-Einzelstränge, weitgehend übereinstimmende biologische Aktivität auf.

25 Für die heterologe Expression von PDGF-AB Heterodimeren in eukaryontischen Systemen gelten die eingangs erwähnten Kriterien der simultanen Expression zweier (oder mehrerer) Proteine. Die bisher publizierten Strategien zur Herstellung von PDGF-AB in rekombinanten CHO-Zellen (Östman et al., 1988) und mit Hilfe von
30 Hefe-Expressionssystemen [EP 0 259 632] entsprechen dem oben unter 2) erläuterten Fallbeispiel, wo sich beide PDGF-Gene in unabhängigen Transkriptionseinheiten auf einem Vektor befinden. Die Quantifizierung der auf diese Weise in CHO-Zellen exprimierten unterschiedlichen PDGF-Dimere ergab 19% für PDGF-AA, 69% für
35 PDGF-AB und 12% für PDGF-BB (Östman et al., 1988).

Eine Grundvoraussetzung für die bevorzugte Synthese von PDGF-AB Heterodimeren mit Hilfe eukaryontischer Expressionssysteme ist nicht nur in der stöchiometrischen Repräsentanz beider Gene, sondern in erster Linie auch in deren koordinierter Expression zu sehen. Daher bieten sich bicistronische Expressionseinheiten als mögliche Hilfsmittel für die Expression heterodimerer Proteine und damit des PDGF-AB an. In WO 90/01550 wird ein derartiges System auch für die Expression von PDGF beschrieben. Wie unter Punkt 3) oben näher erläutert, liefern diese Konstrukte jedoch nur sehr limitierte Expressionsraten für das zweite (und nachfolgende) Cistron(s). Abhängig von der im ersten Cistron lokalisierten PDGF-Kette werden vorwiegend Homodimere dieses Typs gebildet. Bisher in der Literatur beschriebene Versuche, beide PDGF-Gene mit Hilfe anderer Expressionssysteme in einer eukaryontischen Zelle zu exprimieren, führten zu Homodimer-Nebenproduktanteilen im Bereich von 30% oder mehr. Um dennoch mit diesen Zellsystemen hochreines PDGF-AB zu erhalten, müssen aufwendige und extrem verlustreiche Reinigungstechniken angewendet werden.

20

Es ist demgemäß Aufgabe der Erfindung, Mittel zu schaffen, mit deren Hilfe die rekombinante Herstellung von 2 oder mehreren Polypeptiden oder deren Untereinheiten in jeweils äquimolaren Mengen möglich ist und die weiterhin die bevorzugte Bildung von Hetero(di)meren gewährleisten. Ausbeute und Wirtschaftlichkeit der nachgeschalteten Proteinreinigungsverfahren wird dadurch beträchtlich verbessert.

Zur Lösung der Aufgabe wird erfindungsgemäß eine multicistronische Expressionseinheit zur äquimolaren Expression von Polypeptiden oder Untereinheiten derselben in Säugerzellen als Wirtszellen vorgeschlagen, welche gekennzeichnet ist durch die allgemeine Formel

35

$$p - 5'UTR - C_1 - (IRES - Y - C_2)_n - 3'UTR - polyA,$$

- 10 -

in der

"p" ein transkriptionaler Promotor ist,

5 "5'UTR" eine nicht translatierte Nukleotidsequenz ist,

n 1, 2 oder 3 ist,

10 "C₁" und "C₂" Cistrons sind, welche jeweils ein für ein Polypeptid oder dessen Untereinheit kodierendes Gen enthalten, wobei dann, wenn n 2 oder 3 ist, die Sequenzen C₂ der aufeinanderfolgenden Gruppen (IRES-Y-C₂) untereinander gleich oder verschieden sein können und ferner C₁ und C₂ gleich oder verschieden sein können,

15

"IRES" eine Nukleotidsequenz viralen, zellulären oder synthetischen Ursprungs ist, die in der Stufe der Translation für die interne Initiation verantwortlich ist,

20

"Y" eine Nukleotidsequenz ist, welche im Zusammenwirken mit IRES für eine Expression des (der) in C₂ enthaltenen Gens(e) auf solche Weise sorgt, daß die Genprodukte von C₁ und C₂ in äquimolaren Mengen exprimiert werden,

25

"3'UTR" eine nicht translatierte Nukleotidsequenz ist

und

30

"polyA" ein Polyadenylierungssignal ist.

35 In den patentgemäßen Konstrukten wurde durch Einführung interci-stronischer Elemente eine Äquivalenz der Translationseffizienz erreicht und überraschenderweise eine 1:1 Stöchiometrie der Genprodukte gefunden. Damit ist die wesentliche Grundlage für

- 11 -

die Expression von Hetero(di)meren in Animalzellen geschaffen. Dadurch, daß die Expressionskapazität der Zelle auf der Ebene der Transkription und Translation voll ausgeschöpft ist und zudem als Folge einer nahezu vollständig erfolgten Heterodimerisierung aufwendige Reinigungsschritte zur Entfernung von Homo(di)meren weitestgehend entfallen können, wird eine hohe Wirtschaftlichkeit der Produktion des jeweiligen Proteins in Säugerzellen gewährleistet.

10 In den erfindungsgemäßen Expressionseinheiten kommen als Promotoren alle diejenigen Promotoren in Betracht, die in eukaryontischen Zellen wirksam sind, d. h., die die Genexpression in eukaryontischen Zellen initiieren können. Insbesondere können alle konstitutiven und induzierbaren Promotoren viralen (beispiels-
15 weise die retroviralen "Long terminal repeats (LTR's) oder der frühe Promotor des Cytomegalie-Virus (CMV), zellulären (beispielsweise die humanen Actin- oder Ubiquitin-Promotoren) oder synthetischen Ursprungs verwendet werden. Erfindungsgemäß ist der SV40-Promotor bevorzugt.

20

Die 5'UTR und die 3'UTR sind beliebige, in der Regel nichttranslatierte Nukleotidsequenzen, die regulierende Elemente enthalten können und die der operativen Verknüpfung von "C₁" bzw. "C₂" mit den Transkriptionskontrollelementen dienen. Erfindungsgemäß
25 geeignet ist beispielsweise die SV-40-Sequenz aus pBEH nach Artelt et al. (1988).

Als IRES können alle diejenigen Sequenzen viralen, zellulären oder synthetischen Ursprungs verwendet werden, welche eine in-
30 terne Bindung der Ribosomen vermitteln. Beispiele für derartige Sequenzen sind die IRES aus *Poliovirus* Typ 1, 2 oder 3 sowie ferner die 5'UTR des *Encephalomyocarditis Virus* (EMCV), des "*Theilers murine encephalomyelitis virus*" (TMEV), des "*foot and mouth disease virus*" (FMDV), des "*bovine enterovirus*" (BEV), des
35 "*coxsackie B virus*" (CBV), des "*human rhinovirus*" (HRV) und die "*human immunoglobulin heavy chain binding protein*" (BIP) 5'UTR,

die *Drosophila Antennapediae* 5'UTR, die *Drosophila Ultrabithorax* 5'UTR oder genetische Hybride oder Fragmente aus den oben angeführten Sequenzen. Erfindungsgemäß bevorzugt ist die IRES aus Poliovirus Typ 1 gemäß SEQ ID Nr. 5 welche die ersten 628 Nukleotide der 5' nicht-translatierten Region des Poliovirus Typ 1 einschließt.

Als "Y" können alle diejenigen Nukleotidsequenzen eingesetzt werden, die im Zusammenwirken mit IRES wie in der allgemeinen Formel angegeben für eine Expression des (der) in C₂ enthaltenen Gens(e) auf solche Weise sorgt, daß die Genprodukte von C₁ und C₂ in äquimolaren Mengen exprimiert werden. Insbesondere kommen die *Xenopus laevis* β -Globin 5' UTR (Falcone and Andrews, 1991; Patient et al., 1983), die *Alfalfa mosaic virus* RNA4 5' UTR (Jobling and Gehrke, 1987), die Ferritin 5' UTR (animal, Klausner and Harford, 1989), die *Tobacco mosaic virus* 5' UTR ("Omega") plus Leadermutanten (Gallie et al., 1987A, 1987B; Gallie et al., (1988), die *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) 5' UTR, die *Brome mosaic virus* (BMV) RNA3 5' UTR und die *Rous sarcoma virus* (RSV) 5' UTR (vgl. jeweils Gallie et al., 1987B), die Adenovirus tripartite leader (L1-3) und Varianten (Berkner, Zymogenetics) WO 90/01550; Berkner and Sharp (1985); Kaufman (1985), die *Xenopus borealis* 5' UTR β -Globin und die *Xenopus tropicalis* 5' UTR β -Globin (vgl. jeweils Knoechel et al., 1986) in Betracht, wobei die β -Globinsequenz aus *Xenopus laevis* gemäß SEQ ID NO: 4 erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist IRES die Poliovirus Typ 1 UTR gemäß SEQ ID NO: 3 und "Y" die β -Globinsequenz aus *Xenopus laevis* gemäß SEQ ID NO: 4.

Weitere geeignete IRES und "Y" Sequenzen können zudem mit dem unten näher beschriebenen Verfahren, welches ebenfalls Teil der Erfindung ist, ermittelt werden.

- 13 -

Die Cistrons C₁ und C₂ können unabhängig voneinander und in beliebiger Reihenfolge jeweils ein Gen enthalten, welches für eine Polypeptid-Komponente eines aus 2 oder mehreren derartiger Komponenten bestehenden singulären oder heteromeren Proteins kodiert, wobei die Gene erfindungsgemäß äquimolar exprimiert werden und die Komponenten demgemäß innerhalb einer Wirtszelle jeweils im Verhältnis 1:1 zur Verfügung stehen. Es können also die Cistrons C₁ und C₂ untereinander gleich oder verschieden sein, und die Cistrons C₂ der aufeinanderfolgenden Gruppen (IRES-Y-C₂) können untereinander gleich oder verschieden sein. Insbesondere können C₁ und C₂ jeweils Gene enthalten, welche für die verschiedenen Untereinheiten von Faktor VIII, Kreatin-Kinase, Hämoglobin, Immunglobulinen, Histokompatibilitäts-Antigenen, T-Zell Rezeptoren, Scatter-Faktor (HGF-SF), Mitglieder aus der Familie des Transforming Growth Factor Typ β , Bone Morphogenic Protein (BMP), Mitglieder der Integrin-Familie, Mitglieder der Inhibin-Familie, PDGF oder deren natürliche oder synthetische Varianten und Derivate kodieren.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung PDGF-AB; demgemäß ist in der besonders bevorzugten Expressionseinheit "n" gleich 1, und C₁ und C₂ enthalten alternativ ein für die A- oder die B-Kette von PDGF, ein biologisch aktives Analogon oder ein Fragment derselben kodierendes Gen, wobei beide Gene gleichzeitig in der Expressionseinheit vertreten sind.

Prinzipiell mußten jedoch für die Produktion von PDGF-AB zusätzlich Veränderungen am PDGF-B-precursor vorgenommen werden, da sich PDGF-A- und B-Vorläufermoleküle in ihren biophysikalischen Eigenschaften unterscheiden. Es ist bekannt, daß die Expression von PDGF-B nicht zwangsläufig mit der Sekretion biologisch aktiven Materials korreliert. Ein Großteil des exprimierten PDGF-BB bleibt in enger Assoziation mit der Cytoplasmamembran (Robbins et al., 1985). In CHO-Zellen ist die Expression von PDGF-B mit Hilfe monocistronischer Expressionsvektoren deutlich geringer

als die von PDGF-A. Die Ursache hierfür liegt darin, daß PDGF-BB extrazellulär über eine elektrostatische Wechselwirkung an der Plasmamembran der Produzentenzelle zurückgehalten und nur zu einem geringen Teil in das Medium abgegeben wird (La Rochelle et al., 1990; La Rochelle et al., 1991; Östman et al., 1991). Für die Vermittlung der Retention ist ein kurzer Abschnitt des C-terminalen Bereich des PDGF-B-precursors verantwortlich (Östman et al., 1991). In den patentgemäßen Konstrukten wurde dieser Abschnitt der PDGF-B-Vorläufersequenz durch die Einführung eines

10 Stop-codons an das 3'-Ende der reifen PDGF-B-Kette entfernt. Die entsprechend verkürzte DNA-Sequenz für den PDGF-B-precursor wird als B190 gekennzeichnet. Sekretiertes PDGF-BB aus Kulturüberständen von Zellen, die mit diesem Konstrukt transformiert wurden, wird als B* bezeichnet.

15

Zur Herstellung von PDGF-AB nach der Erfindung können C₁ oder C₂ die PDGF-A_x- (SEQ ID Nr. 1) oder die PDGF-A_L Vorläufer-Sequenz, die vollständige PDGF-B Vorläufersequenz (SEQ ID Nr. 3), das v-sis-Gen aus Simian Sarcoma Virus oder die Basenpaare 283 bis 609

20 gemäß SEQ ID Nr. 3 oder ein Genfragment enthalten, das für ein PDGF-B-Vorläufermolekül kodiert, welches durch Ersetzen des für Arginin kodierenden Codons in der Aminosäureposition 191 des PDGF-B-precursors durch ein Translations-Stop-Codon verkürzt ist. Die vorgenannten Gene können in beliebiger Kombination

25 vorliegen, soweit jeweils ein für die A- und die B-Kette kodierendes Gen vorhanden ist.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist eine Expressionseinheit, in der C₁ und C₂ alternativ die PDGF-A_x-Sequenz (SEQ ID Nr. 1)

30 oder die verkürzte PDGF-B Vorläufersequenz (SEQ ID Nr. 24) enthalten und beide Gene gleichzeitig in der Expressionseinheit vertreten sind.

Zur Ermittlung weiterer geeigneter IRES und "Y" Sequenzen wie

35 unten im Einzelnen beschrieben dienen Expressionseinheiten, in denen "n" 1 ist und C₁ und C₂ voneinander verschiedene Reporter-

gene enthalten. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält eine derartige Expressionseinheit als Reportergene die für Luciferase (SEQ ID Nr. 22) und für sekretorische alkalische Phosphatase (SEQ ID Nr. 20) kodierenden Gene.

5

Gegenstand der Erfindung sind ferner rekombinante DNA Vektoren, welche die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten operativ inseriert enthalten. Erfindungsgemäß bevorzugte Vektoren und deren Herstellung sind in den Figuren 1 bis 6C dargestellt.

10

Die Erfindung schließt ferner Wirtszellen ein, welche Säugerzellen sind und die mit einem Vektor transformiert sind, der die erfindungsgemäße Expressionseinheit operativ inseriert trägt. Vorzugsweise handelt es sich um CHO- oder BHK-Zellen.

15

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft Wirtszellen, insbesondere BHK-Zellen, die mit Vektoren transformiert sind, die eine der für PDGF-AB kodierenden Expressionseinheiten tragen, wie sie oben im einzelnen beschrieben sind. Vorzugsweise handelt es sich um Vektoren, in denen C₁ und C₂ alternativ die PDGF-A_x-Sequenz (SEQ ID Nr. 1) oder die vollständige (SEQ ID Nr. 3) bzw. die verkürzte (SEQ ID Nr. 24) PDGF-B Vorläufersequenz enthalten.

25 Erfindungsgemäß transformierte PDGF-AB produzierende BHK-Zellen wurden unter der Bezeichnung 92-22-6 (pSBC-PDGF-A/-G-B190, s. Tab. 2) entsprechend DSM ACC 2048 oder 92-22-7 (pSBC-PDGF-B190/G-A, s. Tab. 2) entsprechend DSM ACC 2049 am 11. 8. 1992 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
30 (DSM) hinterlegt.

Zur Ermittlung weiterer geeigneter IRES oder "Y" Sequenzen werden Wirtszellen kultiviert, die mit Vektoren transformiert sind, die Reportergene enthaltende Expressionseinheiten tragen, wie
35 sie oben im einzelnen beschrieben sind. Vorzugsweise handelt es sich um erfindungsgemäße Vektoren, welche die für Luciferase und

- 16 -

für sekretorische alkalische Phosphatase kodierenden Gene enthalten.

Erfindungsgemäß mit den Genen für Luciferase (SEQ ID Nr. 22) und
5 sekretorische alkalische Phosphatase (SEQ ID Nr. 20) transformierte Wirtszellen wurden unter der Bezeichnung 91-46-9 (pSBC-SEAP/-G-LUC, s. Tab. 1) entsprechend DSM ACC 2046 und 91-46-10 (pSBC-G-SEAP/LUC, s. Tab. 1) entsprechend DSM ACC 2047 am 11. 8. 1992 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zell-
10 kulturen GmbH (DSM) hinterlegt.

Die Erfindung schließt ferner Verfahren zur Herstellung von solchen Proteinen ein, die aus äquimolaren Anteilen unterschiedlicher Polypeptiduntereinheiten bestehen, indem man Wirtszellen,
15 die mit den oben im einzelnen beschriebenen erfindungsgemäßen Expressionseinheiten transformiert sind, in einem geeigneten Medium kultiviert und das so erzeugte Protein von den Zellen und dem Medium abtrennt.

20 Beispielsweise können auf diese Weise Proteine wie Faktor VIII, Kreatin-Kinase, Hämoglobin, Immunglobuline, Histokompatibilitäts-Antigene, T-Zell Rezeptoren, Scatter-Faktor (HGF-SF), Mitglieder aus der Familie des Transforming Growth Factor Typ β , Bone Morphogenic Protein (BMP), Mitglieder der Integrin-Familie,
25 Mitglieder der Inhibin-Familie, PDGF oder natürliche oder synthetische Varianten oder Derivate derselben hergestellt werden.

Mit den erfindungsgemäßen Vektoren ist es auch erstmals möglich, Dimere des PDGF oder anderer Proteine, von denen verschiedene
30 Spliceformen existieren, wie beispielsweise VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) zu erzeugen, die bisher nicht ohne weiteres herstellbar waren, wie dimeres PDGF-A des Typs lange/kurze Kette, PDGF-A_L/PDGF-A_K oder Moleküle des Typs PDGF-B/v-sis. Eine andere Möglichkeit stellen Di- oder Multimere dar, in denen nur
35 eine Kette Signalsequenzen für eine posttranslationale Modifikation, beispielsweise ein Glykosylierungssignal, enthält. Damit

- 17 -

sind also "einseitig" glykosylierte oder anderweitig modifizierte Proteine herstellbar.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung dient das Verfahren zur Herstellung von heterodimerem rPDGF-AB indem man Wirtszellen, die mit Vektoren transformiert sind, welche erfindungsgemäße Expressionseinheiten tragen, die für die PDGF-A- und B-Ketten kodierende Gene tragen, in einem geeigneten Medium kultiviert, wie oben im einzelnen beschrieben. Das so erzeugte rPDGF-AB wird anschließend von den Zellen und dem Medium abgetrennt.

In Beispiel 2 konnte gezeigt werden, daß es mit Hilfe der erfindungsgemäßen bicistronischen Vektorsysteme möglich ist, ausschließlich oder nahezu ausschließlich PDGF-AB Heterodimere zu erzeugen und der Synthese von PDGF-Homodimeren entgegenzuwirken. Unerwarteterweise wird in diesem Konstrukt die Expressionshöhe des zweiten Cistrons derart stimuliert, daß diese der Expressionshöhe des ersten Cistrons entspricht.

20

Vorzugsweise werden in diesem Zusammenhang erfindungsgemäß BHK Zellen kultiviert, die mit Vektoren transformiert sind, in denen C₁ und C₂ alternativ jeweils die PDGF-A_x-Sequenz (SEQ ID Nr. 1) oder die vollständige (SEQ ID Nr. 3) bzw. die verkürzte (SEQ ID Nr. 24) PDGF-B Vorläufersequenz enthalten.

Als Medium kommen alle bekannten Medien zum Kultivieren von Säugerzellen in Betracht, einschließlich synthetischer, proteinfreier oder proteinarmer Produktionsmedien. Erfindungsgemäß wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), angereichert mit 4,5 g/l Glukose und 5 bis 10 % FCS, bevorzugt.

Das rPDGF-AB kann nach herkömmlichen Verfahren (vgl. beispielsweise Östmann et al. 1988), von den Zellen und dem Medium abgetrennt werden. Vorzugsweise bietet sich ein für PDGF-AA aus BHK-

35

Zellen entwickeltes und hoch effizientes Verfahren (Eichner et al., 1989) an.

Gegenstand der Erfindung ist schließlich heterodimeres rPDGF-AB, 5 welches im wesentlichen frei ist von homodimeren Begleitprodukten und welches erhältlich ist durch Kultivieren der oben beschriebenen, erfindungsgemäßen Wirtszellen. Überraschenderweise hat es sich gezeigt, daß die mit dem erfindungsgemäßen Konstrukt transformierten Wirtszellen das heterodimere PDGF-AB mit einer 10 Reinheit von 90% und mehr, bezogen auf die Gesamtmenge des gebildeten PDGF, sezernieren. Erfindungsgemäß bevorzugt ist heterodimeres PDGF-AB, welches zugänglich ist durch Kultivieren von BHK-Zellen, transformiert mit dem erfindungsgemäßen Konstrukt.

15

Das erfindungsgemäße rPDGF-AB unterscheidet sich von den bisher bekannten rekombinanten PDGF-AB Produkten in erster Linie durch seinen hohen Reinheitsgrad. Wie eingangs ausgeführt, ist bisher kein rekombinantes Verfahren beschrieben worden, bei dem 90% und 20 mehr des erhaltenen Produktes aus dem Heterodimeren besteht. Da die vollständige Abtrennung der Homodimeren von dem Heterodimeren nahezu unmöglich ist, sind die bekannten Produkte zwangsläufig Gemische aus allen 3 Isoformen.

25 Darüberhinaus haften den bekannten Produkten, abhängig von deren Herstellung, in mehrfacher Hinsicht Nachteile an. So ist es bekannt, daß die heterologe Genexpression in Hefezellen, wie in EP 259 632 oder 288 307 beschrieben, zu Proteinprodukten mit gegenüber dem humanen Produkt veränderten Glykosylierungsmustern 30 führt. Zudem ist in Hefezellen exprimiertes PDGF-B zumindest teilweise unvollständig prozessiert und/oder proteolytisch abgebaut (vgl. WO 912/01716). Derartige Produkte weisen somit ein verändertes Kohlenhydratmuster auf, und sie sind mit proteolytischen Abbauprodukten verunreinigt. Zur Vermeidung der vorge- 35 nannten Nachteile beschreibt die WO 92/01716 Verfahren zur Herstellung modifizierter PDGF-Ketten, bei denen die Konsensus-

Sequenzen für die Glykosylierung bzw. die Protease sensitiven Domänen entfernt sind. Derartige Modifikationen beeinflussen jedoch die biologische Aktivität des Produktes (vgl. WO 92/01716).

5

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird durch Kultivieren von erfindungsgemäß transformierten BHK-Zellen, beispielsweise durch Kultivieren derjenigen Zellen, welche unter der Bezeichnung 92-22-6 entsprechend DSM ACC 2048
10 oder 92-22-7 entsprechend DSM ACC 2049 am 11. 8. 1992 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) hinterlegt wurden, heterodimeres rPDGF-AB gewonnen.

Zwar ist aus der WO 90/08163 die rekombinante Herstellung von
15 PDGF-AB in Bakterienzellen, insbesondere in *E. coli* bekannt, welche zwangsläufig zu einem nicht glykosylierten Produkt führt. Eine nach diesem Verfahren in *E. coli* Zellen exprimierte PDGF-B Kette ist jedoch aminoterminal um 12 Aminosäuren verkürzt. Darüberhinaus muß das Produkt aus Bakterien *in vitro* renaturiert
20 werden, ein Vorgang, bei dem die korrekte inter- und intramolekularen Bildungen der Disulfidbrücken und die korrekte Faltung des Proteins nicht gewährleistet ist, mit der Folge, daß die immunologischen Eigenschaften des Produkts verändert und die biologische Aktivität beeinflußt werden können.

25

Das heterodimere rPDGF-AB gemäß der Erfindung wird vorzugsweise zusammen mit pharmazeutisch verträglichen Hilfs- und Trägerstoffen als pharmazeutisches Präparat, insbesondere für die Wundheilung formuliert. In diesem Zusammenhang kann es als Wirkstoff in
30 Pflastern, Wundverbänden und dergleichen enthalten sein. Es ist besonders für die topische Verabreichung geeignet, es kommen jedoch auch Applikationen in Betracht, in deren Verlauf der Wirkstoff in die Wunde eingebracht oder subkutan verabreicht wird. Beispielsweise kann das PDGF-AB in einer geeigneten Matrix
35 mit Depotfunktion im Wundrandbereich subkutan appliziert werden oder direkt subkutan injiziert werden.

Ferner eignet sich das erfindungsgemäße heterodimere rPDGF-AB zur Herstellung von kosmetischen Präparaten, zum Beispiel zur Hautregeneration, zur Hautglättung, zur Verhinderung der Narbenbildung oder der Hautalterung sowie zur Anwendung bei Sonnenbrand.

Geeignete Hilfs- und Trägerstoffe schließen Cellulose-Gele auf wässriger Basis, biologisch abbaubare Polymere sowie jegliche Salben- und Cremebasis und Sprays ein. Ferner können zusätzliche Wirkstoffe, welche die Wundheilung beeinflussen, wie beispielsweise Kollagen, Fibronectin, Faktor XIII, Fibroblasten Wachstumsfaktor (aFGF, bFGF), Transformierender Wachstumsfaktor Typ α oder β , Epidermis Wachstumsfaktor, Insulin oder Insulin-Like Growth Factor (IGF I, II) oder weitere Wachstumsfaktoren in den erfindungsgemäßen Präparaten enthalten sein. Die erfindungsgemäßen Produkte können beispielsweise auch in Wundverbänden in wässriger Lösung vorliegen.

Wie oben dargelegt liegt der Erfindung die Erkenntnis zugrunde, daß durch den Einbau einer bestimmten Sequenz "Y" die IRES-abhängige Translation von C_2 so gesteigert werden kann, daß sie die "cap"-abhängige Translationseffizienz erreicht. Die Sequenz "Y" ist demgemäß in der Lage, mit der IRES so zu kooperieren, daß es zu einer Steigerung der IRES-abhängigen Translationsinitiation kommt, welche mindestens der Effizienz der cap-abhängigen Translationseffizienz entspricht. Sequenzen "Y", welche diese Funktion erfüllen, sind oben ausführlich beschrieben. Patentgemäß wird die β -Globin 5'UTR aus *Xenopus laevis* bevorzugt.

Weitere Sequenzen, welche die erfindungsgemäßen Voraussetzungen erfüllen, lassen sich nach einem Verfahren ermitteln, bei dem zum Auffinden von translations-beeinflussenden Sequenzen "Y", welche im Zusammenwirken mit IRES in Expressionseinheiten nach der Erfindung die äquimolare Expression der Genprodukte von C_1 und C_2 bewirken,

- 21 -

- 5 (a) die zu untersuchenden Sequenzen als Y in bi- oder multicistronische Expressionseinheiten eingebracht werden, in denen C₁ und C₂ jeweils ein Reportergen enthalten, wobei diese Gene für verschiedene und leicht voneinander differenzierbare Genprodukte kodieren,
- 10 (b) Vektoren konstruiert werden, welche die jeweilige Expressionseinheit operativ insertiert enthalten,
- (c) Säugerkzellen als Wirtszellen mit den Vektoren aus Stufe (b) transformiert und in einem geeigneten Medium kultiviert werden, und
- 15 (d) die Expressionsprodukte von C₁ und C₂ in dem Medium oder nach Abtrennen von den Zellen und/oder dem Medium quantifiziert werden.

Vorzugsweise werden in Stufe (c) CHO- oder BHK-Zellen als Wirtszellen verwendet werden, wobei BHK-21-Zellen besonders bevorzugt sind.

25 Alternativ können weitere IRES Sequenzen, welche die erfindungsgemäßen Voraussetzungen erfüllen, nach einem Verfahren ermittelt werden, bei dem man zum Auffinden von translations-initiierenden Sequenzen IRES, welche im Zusammenwirken mit "Y" in Expressionseinheiten nach den Ansprüchen 1 bis 15 die äquimolare Expression der Genprodukte von C₁ und C₂ bewirken,

- 30 (a) die zu untersuchenden Sequenzen als IRES in Expressionseinheiten einbringt, in denen C₁ und C₂ jeweils ein Reportergen enthalten, wobei diese Gene für verschiedene und leicht voneinander differenzierbare Genprodukte kodieren,

- 22 -

- (b) Vektoren konstruiert, welche die jeweilige Expressionseinheit operativ insertiert enthalten,
- 5 (c) Säugerzellen als Wirtszellen mit den Vektoren aus Stufe (b) transformiert und in einem geeigneten Medium kultiviert, und
- 10 (d) die Expressionsprodukte von C_1 und C_2 in dem Medium oder nach Abtrennen von den Zellen und/oder dem Medium quantifiziert.

Vorzugsweise werden in diesem Verfahren CHO- oder BHK-Zellen als Wirtszellen verwendet und in besonders bevorzugter Weise BHK-Zellen, die als Reportergene die für Luciferase und für sekretorische alkalische Phosphatase kodierenden Gene, (LUC) bzw. (SEAP), enthalten.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Figuren und Beispielen erläutert.

I. Beschreibung der Figuren:

Fig. 1) Herstellung der Basisvektoren pSBC-1 und pSBC-2

5 Für die Konstruktion des Vektors pSBC-1 wurde ein 627 bp MseI/BalI-Fragment aus dem Plasmid pGEM3-5'Polio (M) (Sarnow, 1989) als Matritze für eine PCR mit folgenden Primern verwendet (Fig. 1):

10 5'-Polio1 5' TTT CTGCAG AAGCTT AAAACAGCTCTGGG^{3'} (SEQ ID Nr. 14)
PstI HindIII

3'-Polio2 5' TT GCGGCCGC AATCCAATTCGCTTTATG^{3'} (SEQ ID Nr. 15)
NotI

15

Das nach der Amplifikation erhaltene 652 bp Fragment wurde mit Pol I K behandelt, anschließend mit PstI gespalten und in den entsprechend präparierten Vektor pBEH (Artelt et al., 1988) insertiert. Für die Konstruktion des Vektors pSBC-2 wurde das
20 Plasmid pBEH mit EcoRI linearisiert und die folgenden Oligonukleotid-sequenzen hybridisiert und insertiert:

E-N-E1 5' AATT GCGGCCGC G^{3'} (SEQ ID Nr. 16)
E-N-E2 3' CGCCGGCG CTAA^{5'} (SEQ ID Nr. 17)

25

Fig. 2A und B) Konstruktion der Expressionsvektoren pSBC-LUC/SEAP und pSBC-SEAP/LUC

30 Die kodierenden cDNA-Sequenzen der Gene für Luciferase und sekretierte alkalische Phosphatase wurden unter Verwendung von EcoRI/HindIII Restriktionen in die monocistronischen Vektoren pSBC-1 und -2 insertiert (Fig. 2A und 2B). Die Fusion beider Vektoren zu einer bicistronischen Expressionseinheit wurde mit
35 Hilfe der Restriktionsenzyme XmnI/NotI durchgeführt.

Fig. 2C) Konstruktion der Plasmide pSBC-SEAP/-G-LUC und pSBC-LUC/-G-SEAP

Die Expressionskonstrukte pSBC-SEAP/-G-LUC und pSBC-LUC/-G-SEAP
5 leiten sich aus den in Fig. 2A und 2B dargestellten Plasmiden
ab. Sie enthalten zusätzlich das Oligomer G (SEQ ID Nr. 6), das
in die singuläre NotI-site ligiert wurde. Das Oligomer G ist so
konstruiert, daß durch Ligation in die NotI-site die 5'-NotI-
site verloren geht (eine SalI-site ist hier enthalten), aber die
10 3'-NotI-site erhalten bleibt.

Fig. 3) Schematische Darstellung des Vektors M13BCL1

In der Vektorkarte ist der *c-sis* (PDGF-B) homologe Bereich aus
15 pMVW-2 angegeben. Der Bereich des reifen PDGF-B und der NcoI/
SalI Adapter sind durch schwarze Balken hervorgehoben.

Fig. 4) Rekonstitution der vollständigen PDGF-B-Vorläufersequenz

20 Das Plasmid pMVW-2 enthält die cDNA des humanen PDGF-B Gens,
welches im 5'-translatierten Bereich der Vorläufersequenz un-
vollständig ist (Weich et al., 1986). Für die Rekonstitution des
authentischen PDGF-B precursors wurde in den 5'-terminalen Be-
reich des Vorläufers durch einen C-T-Austausch in Position 30
25 des codogenen Abschnittes des Klon pMVW-2 eine BclI-Schnitt-
stelle eingeführt. Durch diesen Schritt geht letztlich nur ein
kurzer Abschnitt des kodierenden Bereiches verloren und die
lokal codierte Aminosäure (Asparaginsäure) bleibt dabei erhal-
ten. Da die BclI-Schnittstelle in den meisten *E.coli*-Stämmen
30 durch Methylierung resistent gegenüber enzymatischer Spaltung
ist, muß das diese Schnittstelle enthaltene Fragment entweder in
einen dam⁻-Stamm umkloniert, oder über einen PCR-Schritt amplifi-
ziert werden. Der fehlende Bereich des Vorläufers wird dann als
synthetisches SalI/BclI-Fragment [Oligomere PPDGFB1 und PPDGFB2]
35 eingesetzt.

Hierfür wurde zunächst das 914 bp BamHI/NcoI-Fragment aus pMVW-2 über einen synthetischen Adapter [Oligomere NCCLSA1, SEQ ID Nr. 9 und NCCLSA2, SEQ ID Nr. 10] in den BamHI/SalI-gespaltenen Bakteriophagen M13mp19 (Pharmacia) insertiert. Dieses Konstrukt lieferte die notwendige Einzelstrang-DNA für den nachgeschalteten *in vitro* Mutageneseschritt, der mit Hilfe des Oligomer-directed *in vitro* mutagenesis system (Version 2) der Fa. Amersham, basierend auf der Methode von Eckstein et al. [Taylor et al., (1985), Nakamaye K. und Eckstein F. (1986), Sayers et al. (1988)] durchgeführt wurde. Durch den synthetischen Primer PDGGBCL (SEQ ID NR. 11) wird nach der Mutagenese ein Basenaustausch (C zu T) in Position 144 der unter SEQ ID Nr. 3 dargestellten Sequenz erreicht und dadurch im 5'-Bereich des PDGF-B precursors eine BclI-Schnittstelle eingeführt. Dieses Mutagenesederivat wurde als M13BCL1 bezeichnet (Fig. 3).

Ein 1100 bp Fragment aus M13BCL1 wurde über einen PCR-Schritt mit Hilfe der Primer M1317MER (SEQ ID Nr. 7) und M1324MER (SEQ ID Nr. 8) amplifiziert, anschließend einer BclI/HindIII-Restriktion unterworfen und das resultierende 770 bp Fragment isoliert. Die synthetischen Oligomere PPDGFB1 (SEQ ID Nr. 12) und PPDGFB2 (SEQ ID Nr. 13) bilden den fehlenden 5'-Bereich des PDGF-B-Vorläufers bis zur BclI-Schnittstelle. Nach dem Annealing wurde dieses doppelsträngige Oligomer anschließend, zusammen mit dem 770 bp PDGF-B Fragment, in den mit einer SalI/HindIII Restriktion vorbereiteten Vektor pGEM-2 (Promega) ligiert (Fig. 4). Die authentische Sequenz von PDGF-B wurde durch vollständige Sequenzierung verifiziert.

Fig. 5) Herstellung einer sekretorischen PDGF-B-Kette

30

Die Expression des PDGF-B Gens über monocistronische Expressionsvektoren ist in BHK-Zellen geringer als die von PDGF-A. Die Ursache hierfür ist, daß PDGF-BB extrazellulär an der Plasmamembran der Produzentenzelle zurückgehalten und nur zu einem geringen Teil in das Medium abgegeben wird (La Rochelle et al., 1991; Östmann et al., 1991). Die Retention von PDGF-B wird durch

35

den carboxyterminalen Bereich, der bei der Freisetzung von PDGF-B natürlicherweise abgespalten wird, vermittelt (La Rochelle et al., 1991). Für die Herstellung einer besser sekretierbaren PDGF-B Variante wurde eine PCR-vermittelte Mutagenese durchgeführt, bei der ein Stopcodon an der Aminosäure in Position 191 des PDGF-B-precursors (Arg) eingefügt wurde. In der so hergestellten Mutante (PDGF-B190, SEQ ID Nr. 24) wird der für die Retention verantwortliche Bereich nicht exprimiert. Das 610 bp lange PCR-Produkt wurde unter Verwendung folgender Primer erhalten (Fig. 5):

PDGF-B190 PrimI 5' GAATTCGAGCTCGCCCGGG³' (SEQ ID Nr. 18)
PDGF-B190 PrimII 5' CCCGGGAAGCTTCCGGTTATCAGGTCACAGGCCGTGC³'
(SEQ ID Nr. 19)

15

Fig. 6A und B) Konstruktion der Expressionsvektoren pSBC-PDGF-A/B und pSBC-PDGF-B/A

Die vollständige codierende cDNA für den PDGF-B precursor (Rat-
ner et al., 1985) liegt in dem Vektor pGEM2-PDGF-B vor (Fig.4).
Die vollständige cDNA-Sequenz der kurzen Variante der PDGF-A-
Kette (Betsholtz et al., 1986) ist im Expressionsvektor pODA
(Eichner et al., 1989) enthalten. Dieser Vektor wurde erhalten
durch Klonierung des RsaI-Fragments aus pPGF-1 (Hoppe et al.,
25 1987) in den SV-40 Expressionsvektor pBEH (Artelt et al., 1988).
Die kodierenden cDNA-Sequenzen der PDGF-A- und -B-Kette wurden
unter Verwendung von EcoRI/HindIII Restriktionen in die monoci-
stronischen Vektoren pSBC-1 und -2 (Fig. 1) inseriert. Die
Fusion beider Vektoren zu einer bicistronischen Expressionsein-
30 heit wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme XmnI/NotI durchge-
führt (Fig. 6A, 6B).

Fig. 6C) Schematische Darstellung der Plasmide pSBC-PDGF-A/-G-B190 und pSBC-PDGF-B190/-G-A

- 27 -

Die Expressionskonstrukte pSBC-PDGF-A/-G-B190 und pSBC-PDGF-B190/-G-A leiten sich aus den in Fig. 6A und 6B dargestellten Plasmiden ab. Sie enthalten zusätzlich das Oligomer G (SEQ ID Nr. 6), das in die singuläre NotI-site ligiert wurde. Das Oligomer G ist so konstruiert, daß durch Ligation in die NotI-site die 5'-NotI-site verloren geht (eine SalI-site ist hier enthalten), aber die 3'-NotI-site erhalten bleibt.

Fig. 7) Sandwich-ELISA zum Nachweis von PDGF-A- bzw. PDGF-B-Kette mit Hilfe von zwei polyklonalen Anti-PDGF-Antikörpern: Eichkurven von PDGF-Standards.

Polystyrolplatten wurden mit Ziege-Anti-PDGF-AB-IgG (polyklonal, von Collaborative Research) beschichtet; nach Inkubation mit verschiedenen PDGF-Standards (s. unten) wurde gebundenes PDGF mit Hilfe von polyklonalem Kaninchen-Anti-PDGF-AA bzw. -Anti-PDGF-BB, gefolgt von Peroxidase-markiertem Anti-Kaninchen-IgG detektiert.

Bei der Anwendung von Anti-PDGF-AA (ELISA I.1) erhält man O.D.-Signale in der Reihenfolge: PDGF-AB > PDGF-AA >> PDGF-BB (7.1). Mit Anti-PDGF-BB (ELISA I.2) ergeben sich maximale O.D.-Werte für PDGF-AB und -BB ab 10 ng/ml, PDGF-AA liefert bis 1000 ng/ml kein Signal (7.2).

[Quelle der Standards: AB: aus humanen Thrombozyten, von Promega Corp. No. G 6191; BB: rekomb. aus Hefe, von Promega Corp. No. G 5191; AA: rekomb. aus BHK-Zellen, ca. 70 %ig, (Eichner et al., 1989)].

Fig. 8) Sandwich-ELISA zum Nachweis von PDGF-AB mit Hilfe eines monoklonalen und eines polyklonalen Anti-PDGF-Antikörpers: Eichkurven von PDGF-Standards.

Polystyrolplatten wurden mit Schaf-Anti-Maus-IgG beschichtet und anschließend mit einem Maus-Hybridoma-Überstand (von Klon 1B3, enthält monoklonale Antikörper gegen die B-Kette in PDGF-AB und -BB) inkubiert; nach Inkubation mit verschiedenen PDGF-Standards

- 28 -

(s. Legende zu Fig. 7) wurde PDGF-AB mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchen-Anti-PDGF-AA, gefolgt von Peroxidase-markiertem Anti-Kaninchen-IgG nachgewiesen.

Für PDGF's aus eukaryontischen Quellen ergibt sich ein spezifisches Signal mit PDGF-AB (aus humanen Thrombozyten) mit einer geringen Kreuzreaktion mit PDGF-BB.

Fig. 9) Nachweis von PDGF-A-Kette bzw. B-Kette in Kulturüberständen von rekombinanten BHK-Zellen mittels ELISA I:

10

Eichkurven von Standards s. Fig. 7.1 und 2; die Proben stammten von BHK-Zellen, die mit folgenden Genen transfiziert worden waren:

Probe 1: pSBC-2-PDGF-A; Probe 2: pSBC-2-PDGF-B ; Probe 3: pSBC-2-G-PDGF-B190; Probe 4: pSBC-PDGF-A/B; Probe 5: pSBC-PDGF-B/A; Probe 6: pSBC-PDGF-A/-G-B190 Probe 7: pSBC-PDGF-B190/-G-A; Probe 8: pSBC-2-PDGF-A + pSBS-2-PDGF-B; Probe 9: pSBC-2-PDGF-A + pSBC-2-G-PDGF-B190; Probe 10: pSBC-Luc/-G-Seap; Probe 11: pSBC-Seap/G-Luc.

20

Tabelle 1) Steigerung der Expression von Reportergenen durch eine insertierte zelluläre Sequenz (Globin) in mono- und bicistronischen Vektoren

25 links: schematische Darstellung der DNA-Konstrukte

	DNA	erwartete Größe der mRNA
	1) pSBC-2-LUC	1870 nt
30	2) pSBC-1-LUC	2497
	3) pSBC-2-G-LUC	1904
	4) pSBC-1-G-LUC	2531
	5) pSBC-SEAP/LUC	4407
	6) pSBC-G-SEAP/LUC	4441
35	7) pSBC-SEAP/G-LUC	4441
	8) pSBC-SEAP/LUC (Delta) Polio	3780
	9) pSBC-LUC/SEAP	4407

- 29 -

- L = Strukturgen für Luciferase
S = Strukturgen für sekretierte alkalische Phosphatase
IRES = "internal ribosomal entry site"
G = Sequenz aus *Xenopus laevis* Globin mRNA
5 pA = poly Adenylierungssite aus SV40

Mitte: Northern Blot Analyse

- 10 Die mRNA aus dem Gesamtpool der BHK-Zellen, die stabil mit den monocistronischen und bicistronischen Expressionskonstrukten für LUC und SEAP transfiziert worden waren, wurde untersucht. Die RNA wurde nach Purchio et al. (1979) isoliert, über ein 1%iges Agarose-Formaldehydgel fraktioniert (Lehrach et al., 1977), auf
15 eine Nylonmembran geblottet und mit [³²P]-markierten Actin-, LUC- und SEAP-spezifischen Sonden hybridisiert. Erwartungsgemäß zeigen die monocistronischen mRNAs eine Größe von etwa 1900 - 2500 nt, während bei den bicistronischen mRNAs die Größe der codierenden Sequenzen beider Reportergene (etwa 3800 - 4400 Nucleoti-
20 de) vorhanden ist. Hiermit ist gezeigt, daß die entsprechenden Genprodukte von einer einzigen bicistronischen mRNA abgelesen werden.

rechts: Ergebnisse für Luciferase- und SEAP-Expression

25

Die Ergebnisse wurden ermittelt, wie unter 1.1 und 1.2 beschrieben.

- 30 Tabelle 2) Produktivität der mono- und bicistronischen Expressionsvektoren für die PDGF-Ketten A und B in BHK-Zellen

- Die PDGF-Konzentration in den Kulturüberständen wurde mit Hilfe des Mitogentests ermittelt. Der spezifische Nachweis von PDGF-AB
35 erfolgte durch ELISA II (s. 2.3, Eichkurven von Standards s. Fig. 8).

II. Beispiele:

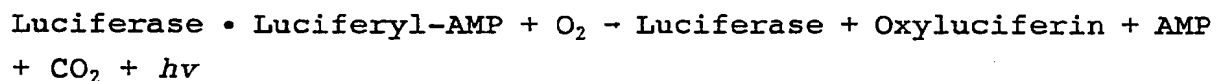
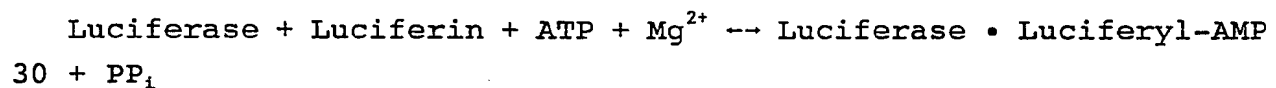
Die in den Beispielen aufgeführten Anwendungen zur Expression basieren auf monocistronischen und bicistronischen Transkriptionseinheiten. Die zu exprimierenden Gene werden jeweils in die Vektoren pSBC-1 bzw. pSBC-2 integriert. Die Vektorkonstruktion vereinfacht das Rekombinieren von pSBC-1 und pSBC-2 zum bicistronischen Vektor, wie es in den Fig. 2A - 2C für die Expression der Gene LUC und SEAP und in den Fig. 6A - 6C am Beispiel der Gene von PDGF-A und PDGF-B gezeigt ist. Nach Transfer des Plasmids pSBC-PDGF-A/-G-B190 (G = β -Globin-Sequenz aus *Xenopus laevis* gemäß SEQ ID Nr.4) in Animalzellen wird PDGF-A cap-abhängig und PDGF-B in Abhängigkeit vom Polio-IRES translatiert. In entsprechender Weise werden pSBC-PDGF-B190/-G-A sowie die Reportergene LUC und SEAP von mono- bzw. bicistronischen mRNA-Molekülen translatiert.

Beispiel 1: Expression der Reportergene LUC und SEAP mit Hilfe des bicistronischen Vektorsystems

20

1.1 Nachweisverfahren für Luciferase

Die Luciferase ist in Zellextrakten enthalten. Ihre Aktivität kann durch Zugabe von Luciferin (Substrat), ATP und Mg^{2+} quantitativ bestimmt werden und als Maß der Aktivität des Luciferasegens gelten. Dabei spielt sich folgende Reaktion ab (de Wet et al., 1987):



35 1.2 Nachweisverfahren für sekretierte alkalische Phosphatase

Alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das die Hydrolyse von gebundenem Phosphat katalysiert. Das membranständige, in Eukaryonten vorkommende Enzym verfügt über einen Glykophospholipidanker, mit dem es C-terminal mit der Membran verbunden ist. Da sezernierte Proteine oft bequemer nachweisbar sind als zellinterne oder membranständige, wurde in die Sequenz der alkalischen Phosphatase aus humaner Placenta (513 Aminosäuren) an Position 489 ein künstliches Terminations-Translationssignal eingeführt (Berger et al., 1988). Die nach Transfektion des entsprechenden Expressionsplasmids hergestellte Proteinmutante wird effizient ins Medium sekretiert und eignet sich hervorragend als Reportermolekül (SEAP = sekretierte alkalische Phosphatase). Der Nachweis kann kolorimetrisch oder luminometrisch erfolgen (Berger et al., 1988).

15

1.3 Herstellung transformierter BHK-Zellen

Die Transfektion der mono- und bicistronischen Expressionsvektoren, die die codierenden Sequenzen der Reportergene LUC und SEAP bzw. der PDGF-A- und B-Kette tragen (vergl. Fig. 2A-C, 6A-C) wurde mit der Calciumphosphat-Präzipitationstechnik in BHK-Zellen durchgeführt (Wigler et al., 1979; Graham & van der Eb, 1973). Einen Tag vor der Transfektion wurden $2-3 \times 10^5$ BHK-Zellen/24 cm² in neue Kulturflaschen umgesetzt. Vier Stunden vor der Transfektion wurde ein Medienwechsel mit DME-Medium durchgeführt. 5 µg der o. g. Plasmid-DNA wurden zusammen mit 0,5 µg der Selektionsplasmide pAG60 und pSV2pac (Colbère-Garapin, 1981; Vara et al., 1986), welche für ein Neomycinresistenzgen bzw. für eine Puromycin-Resistenz kodieren, wurden in 250 µl 250 mM CaCl₂ suspendiert. Die Lösung wurde langsam unter ständiger Verwirbelung durch steril eingeblasene Luft zu 250 µl 2 x HEPES-Puffer (280 mM NaCl; 50 mM HEPES; 1,5 mM NaH₂PO₄ pH 7,1) gegeben und das erhaltene Präzipitat dem Nährmedium zugesetzt. Zwei Tage nach der Transfektion wurde durch Medienwechsel von DME- auf Doppelselektionsmedium (5 µg/ml Puromycin; 500 µg/ml G418)

(Wirth et al., 1988) die Selektion auf stabil transfizierte Zellen begonnen. Repräsentative Klone der PDGF produzierenden bzw. LUC/SEAP produzierenden BHK-Zellen wurden am 11. 8. 1992 bei der DSM wie folgt hinterlegt:

5

- pSBC-PDGF-A/-G-B190 = DSM ACC2048
- pSBC-PDGF-B190/-G-A = DSM ACC2049
- pSBC-SEAP/-G-LUC = DSM ACC2046
- pSBC-G-SEAP/LUC = DSM ACC2047

10

1.4 Expression äquimolarer Mengen der Genprodukte LUC und SEAP durch Einführung einer translationssteigernden Sequenz vor das IRES-regulierte Cistron

15 Die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit den Reportergenkonstrukten pSBC-LUC/SEAP und pSBC-SEAP/LUC in Tab. 1 zeigen, daß die Expression der IRES-abhängigen Translation im bicistronischen Konstrukt immer deutlich geringer ist als die im cap-abhängig translatierten Cistron. Dies entspricht den aus der
20 Literatur bekannten Werten. Die β -Globin Sequenz aus *Xenopus laevis* (SEQ ID Nr. 6) wurde in den mono- und bicistronischen Reportergenkonstrukten in die singuläre NotI-Schnittstelle inseriert (Fig. 2C). In den bicistronischen Expressionsvektoren befindet sie sich unmittelbar zwischen Promotor und 5'UTR des
25 ersten Cistrons bzw. zwischen dem IRES-Element und dem 5'-UTR des zweiten Cistrons.

Die Steigerung der Translationseffizienz der einzelnen Cistrons wurde anhand der Reportergenkonstrukte, wie sie in Fig. 2A - 2C dargestellt sind, gemessen. In Tabelle 1 ist gezeigt, daß die β -
30 Globin-Sequenz die cap-abhängige Translation von Luciferase in der monocistronischen Expressionseinheit um den Faktor 5, die IRES-abhängige Translation in bicistronischen Expressionseinheiten um den Faktor 3 stimuliert. Letzteres führt zur äquimolaren Expression der Cistrons 1 und 2 in bicistronischen Vektoren.
35 Der in der Tabelle 1 dargestellte Northern Blot zeigt, daß die entsprechenden Genprodukte von einer mono- bzw. bicistronischen

mRNA abgelesen werden. Dadurch, daß die spezifischen mRNA-Konzentrationen in der gleichen Größenordnung in den Zellen vorhanden sind, ist bewiesen, daß die expressionssteigernde Wirkung der Globinsequenz sich auf der Ebene der Translation vollzieht.

5

Die äquimolare Expression der Genprodukte des ersten und zweiten Cistrons wurde durch das Einführen des 5'UTR des Globingens aus *Xenopus laevis* (SEQ ID Nr. 6) erreicht.

10 **Beispiel 2:** Expression von PDGF-AB Heterodimer mit Hilfe des bicistronischen Vektorsystems

2.1 Gewinnung konditionierter Zellkulturüberstände

15 Die Transformation der BHK-Zellen erfolgte analog 1.3. Nach dem Auszählen der Kolonien werden die Zellen abtrypsinisiert, in frischem Selektionsmedium aufgenommen und auf eine Zellzahl von 10^5 Zellen/ml eingestellt. Je 10 ml dieser Zellsuspension werden in eine Flasche mit 65 cm² Bodenfläche überführt und für weitere
20 24 h kultiviert. Danach wird das Medium entfernt, der Zellrasen 2x mit PBS gewaschen und das Medium durch 10 ml Produktionsmedium (DMEM, ohne Serum und Selektions-Antibiotika) ersetzt. Nach 24 h wird das Medium abgenommen. Die geernteten Überstände werden bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Die Zellen werden ge-
25 zählt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Zeitpunkt der Ernte beträgt die Zellzahl/Flasche $0.8-1.2 \times 10^7$.

30 2.2 Nachweis von PDGF in den Kulturüberständen mit Hilfe des Mitogentests

Die Messung der Stimulierung der DNA-Syntheserate von dichtearretierten Fibroblasten erlaubt eine Bestimmung der mitogenen Aktivität des PDGF. Eine Unterscheidung zwischen den Isoformen
35 ist dabei nicht möglich, da alle PDGF-Spezies in diesem Test biologisch aktiv sind.

- 34 -

Der Assay wurde gemäß Shipley et al. (1984) mit AKR-2B-Mausfibroblasten in 24-Well-Platten durchgeführt. Reines PDGF zeigt in dem Test eine halbmaximale Stimulierung bei einer Konzentration von etwa 5 ng/ml. Dieser Wert wurde benutzt, um Produktivitäten zu bestimmen. Die Ergebnisse aus dem Mitogentest sind in Tab. 1 den Werten aus dem PDGF-AB-ELISA gegenübergestellt.

2.3 Nachweis von PDGF-AB Heterodimer in den Kulturüberständen mit Hilfe von PDGF-ELISA's

10

Es wurden zwei 'two-antibody sandwich assays' aufgebaut, die I.) eine grobe Quantifizierung der PDGF-A- bzw. der -B-Kette in PDGF-Dimeren und II.) eine spezifische Quantifizierung von PDGF-AB neben PDGF-AA und -BB erlauben.

15

I. Sandwich-Assay mit Hilfe von zwei polyklonalen Anti-PDGF-Antikörpern

20

Polystyrolplatten mit 96 Kavitäten (Fa. Dynatech, U-Platte, No. M124B) werden in folgender Reihenfolge beschichtet (zwischen jedem Schritt jeweils 4 x Waschen mit PBS mit 0,05 % Tween 20):

25

I.1 Polyklonales Ziege-Anti-PDGF-AB-IgG (Fa. Collaborative Research, No. 40017); bindet PDGF-AB, -BB und in geringem Maße -AA), 2 µg/ml in 0,05 M Carbonat/Bicarbonat-Puffer, 50 µl über Nacht bei 4 °C

30

I.2 % BSA (Fa. E. Merck, Nr. 12018) in PBS, pH 7,5, 100 µl für 1 h bei R.T.

I.3 PDGF-haltige Lösungen, verdünnt in PBS mit 0,1 % BSA und 0,05 % Tween 20 (PBS+), 50 µl für 1 h bei R.T.

I.4.1 Polyklonales Kaninchen-Anti-PDGF-AA-IgG (Fa. Genzyme, No. ZP-214, bindet an der A-Kette von dimerem PDGF), 2 µg/ml in PBS+, 50 µl für 1 h bei R.T. (ELISA I.1) bzw.

5 I.4.2 Polyklonales Kaninchen-Anti-PDGF-BB-IgG (Fa. Genzyme, No. ZP-215, bindet an der B-Kette von dimerem PDGF), wie I.4.1 (ELISA I.2)

10 I.5 POD-markiertes Ziege-Anti-Kaninchen IgG (Fa. Pierce, No. 31460), 0,1 µg/ml in PBS+, 50 µl für 1 h bei R.T., Detektion mit dem Substrat Tetramethylbenzidin gemäß E.S. BOS et al. (J. Immunoassay 2 (1981), 187-204).

15 **II. Sandwich-Assay mit Hilfe eines monoklonalen und eines polyklonalen Anti-PDGF-Antikörpers**

20 Dieselben Platten wie im ELISA I werden in folgender Reihenfolge beschichtet (Mengen, Puffer und Inkubationszeiten wie oben):

II.1 Schaf-Anti-Maus-IgG (Fa. Boehringer Mannheim, Nr. 1097 105), 3 µg/ml.

25 II.2 1 % BSA in PBS

30 II.3 Maus-Hybridoma-Überstand von Klon 1B3 [erhalten durch Fusion von SP2/O-Myelomzellen mit Milzzellen von Mäusen, die mit rekomb. PDGF-AB (aus *E.coli* gemäß J. Hoppe et al., 1990) immunisiert worden waren], 2 µg/ml IgG2a/ml. Der monoklonale Antikörper bindet spezifisch an der B-Kette von PDGF-Dimeren.

II.4 PDGF-haltige Lösungen

- 36 -

II.5 Polyklonales Kaninchen-Anti-PDGF-AA-IgG (s. I.4.1), 2 µg/ml

II.6 wie I.5

5

2.4 Expression äquimolarer Mengen der PDGF-Ketten A und B durch Einführung einer translationssteigernden Sequenz vor das IRES-regulierte Cistron

10 Bicistronische Konstrukte mit dem wie in Fig. 5 beschriebenen mutierten PDGF-B sollten zur Expression der PDGF-Ketten A und B im Verhältnis 3:1, entsprechend der Konstellation im bicistronischen Vektor führen. Die äquimolare Expression beider Gene wurde durch das Einführen von translationssteigernden Sequenzen
15 in den 3'-Bereich der internen ribosomalen Eintrittsstelle des Polio-Elements erreicht. Ein solches Element ist z.B. die β -Globin-Sequenz aus *Xenopus laevis* (SEQ ID Nr. 6). Diese β -Globin-Sequenz (Oligomer G) wurde in den bicistronischen Vektoren in die singuläre NotI-Schnittstelle inseriert (Fig. 6C). In den
20 daraus resultierenden Plasmiden befindet sie sich unmittelbar zwischen dem IRES-Element und dem 5'-UTR des zweiten Cistrons.

2.5 Ergebnisse:

25 In Figur 9 und Tabelle 2 sind die Resultate von drei unterschiedlichen Analysen für PDGF aus Kulturüberständen rekombinanter BHK-Zellen dargestellt.

Durch den ELISA I ist es möglich, eine grobe Aussage über die Mengenteile beider PDGF-Ketten zu treffen. Somit können Rück-
30 schlüsse auf die Effizienz der intercistronischen Elemente gemacht und bicistronische Konstrukte charakterisiert werden, in denen annähernd gleiche Mengen von PDGF-A und -B translatiert werden. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß in ELISA I.1 PDGF-AB ein stärkeres Signal als PDGF-AA ergibt.

35 Der Mitogentest liefert einen brauchbaren Wert für die Gesamtmenge des in den Kulturüberständen vorhandenen rPDGF, ohne zwi-

- 37 -

schen den verschiedenen Isoformen (PDGF-AA, AB oder BB) differenzieren zu können.

Der spezifische Anteil an heterodimerem PDGF-AB kann durch den PDGF-AB-spezifischen ELISA II bestimmt werden. Aus der Differenz
5 dieser Analyse zum Ergebnis des Mitogentests kann der prozentuale Anteil von PDGF-Homodimeren mit hoher Genauigkeit ermittelt werden.

Abkürzungen:

5	B190	-	C-terminal verkürzter PDGF-B-precursor (DNA)
	B*	-	PDGF-B-Kette (Protein), hervorgegangen aus verkürztem PDGF-B-precursor
10	BHK	-	Hamsterzelllinie
	bp	-	Basenpaar(e)
	BSA	-	Rinderserumalbumin
15	CHO	-	Hamsterzelllinie
	DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
20	ELISA	-	enzyme-linked immunosorbent assay
	G	-	β -Globin-Sequenz aus <i>Xenopus laevis</i>
	IgG	-	Immunglobulin der Klasse G
25	IRES	-	internal ribosomal entry site
	LUC	-	Luciferase
30	nt	-	Nukleotid(e)
	PBS	-	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
	PCR	-	Polymerase Kettenreaktion
35	PDGF	-	Wachstumsfaktor aus Thrombozyten
	SEAP	-	sekretierte alkalische Phosphatase
	UTR	-	nicht translatierte Region

LITERATUR

- Adam M. A., Ramesh N., Miller A. D., and Osborne W. R. A. (1991)
J. Virol. 65, 4985-4990.
- 5 Artelt P., Morelle C., Ausmeier M., Fitzek M., and Hauser H.
(1988) Gene 68, 213-219.
- Beckmann M. P., Betsholtz C., Heldin C.-H., Westermark B., Di
10 Marco E., Di. Fiore P. P., Robbins K. C., and Aaronson S. A.
(1988) Science 241, 1344-1349.
- Berger J., Hauber J., Hauber R., Geiger R., Cullen B. R. (1988)
Gene 66, 1-10.
- 15 Berkner K. L. and Sharp P. A. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 841-
857.
- Betsholtz C., Johnsson A., Heldin C.-H., Westermark B., Lind P.,
20 Urdea M. S., Eddy R., Shows T. B., Philpott K., Mellor A. L.,
Knott T. J., and Scott J. (1986) Nature 320, 695-699.
- Block L. H., Emmons L. R., Vogt E., Sachinidis A., Vetter W.,
and Hoppe J. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2388-2392.
- 25 Boel E., Berkner K. L., Nexoe B. A., and Schwartz T. W. (1987)
FEBS Lett. 219, 181-188.
- Bywater M., Rorsman F., Bongcam-Rudloff E., Mark G., Hammacher
30 A., Heldin C.-H., Westermark B., and Betsholtz C. (1988) Mol.
Cell. Biol. 8, 2753-2762.
- Colbère-Garapin F., Horodniceanu F., Kourilsky P., and Garapin
A. C. (1981) J. Mol. Biol. 150, 1-14.
- 35 de Wet, J. R., Wood K. V., DeLuca M., Helinski D. R. and Subra-
mani S. (1987) Mol. Cell. Biol. 7, 725-737.
- Eichner W., Jäger V., Herbst D., Hauser H. and Hoppe J. (1989)
40 Eur. J. Biochem. 185, 135-140.
- Falcone D., and Andrews D.W. (1991) Mol. Cell. Biol. 11 (5),
2656-2664.
- 45 Gallie D. R., Sleat D. E., Watts J. W., Turner P. C. and Wilson
T. M. A. (1987A) Nucl. Acids Res. 15, 3257-3272.
- Gallie D. R., Sleat D. E., Watts J. W., Turner P. C. and Wilson
T. M. A. (1987B) Nucl. Acids Res. 15, 8692-8711.
- 50 Gallie D. R., Sleat D. E., Watts J. W., Turner P. C. and Wilson
T. M. A. (1988) Nucl. Acids Res. 16, 883-893.

- Ghattas I. R., Sanes J. R., and Majors J. E. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 22, 5848-5859.
- Graham F., and van der Eb L. (1973) *Virology* 52, 456-487.
- 5 Hambidge S. J., and Sarnow P. (1991) *J. Virol.* 65, 6312-6315.
- Hammacher A., Hellmann U., Johnsson A., Östman A., Gunnarsson K., Westermarck B., Wasteson Å., and Heldin C.-H. (1988) *J. Biol.*
10 *Chem.* 263, 16493-16499.
- Hart C. E., Forstrom J. W., Kelly J. D., Seifert R. A., Smith R. A., Ross R., Murray M. J., and Bowen-Pope D. F. (1988) *Science* 240, 1529-1531.
- 15 Hart C. E., Bailey M., Curtis D. A., Osborn S., Raines E., Ross R., and Forstrom J. W. (1990) *Biochemistry* 29, 166-172.
- Heldin C.-H., Johnsson A., Wennergren S., Wernstedt C., Bets-
20 holtz C., and Westermarck B. (1986) *Nature* 319, 511-514.
- Heldin C.-H., Bäckström G., Östman A., Hammacher A., Rönnstrand L., Rubin K., Nister M., and Westermarck B. (1988) *EMBO J.* 7, 1387-1393.
- 25 Hoppe J., Schumacher L., Eichner W. and Weich H.A. (1987), *FEBS Lett.* 223, 243-246.
- Hoppe J., Weich H. A., and Eichner W. (1989) *Biochemistry* 28,
30 2956-2960.
- Hoppe J., Weich H. A., and Eichner W., and Tatje D. (1990) *Eur. J. Biochem.* 187, 207-214.
- 35 Hosang M., Rouge M., Wipf B., Eggiman B., Kaufmann F., and Hunziker W. (1989) *J. Cell. Physiol.* 149, 558-564.
- Jackson R. J., Howell M. T., and Kaminski A. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 477-483.
- 40 Jang S. K., Kräusslich H., Nicklin M. J. H., Duke G. M., Palmenberg A. C., and Wimmer E. (1988) *J. Virol.* 62, 2636.
- Jang S. K., Davies M. V., Kaufmann R. J., and Wimmer E. (1989)
45 *J. Virol.* 63 (4), 1651-1660.
- Jang S. K., and Wimmer E. (1990) *Genes Dev.* 4, 1560-1572.
- Jobling S. A. and Gehrke L. (1987) *Nature* 325, 622-625.
- 50 Johnsson A., Heldin C.-H., Wasteson A., Westermarck B., Deuel T. F., Huang J. S., Seeburg P. H., Gray A., Ullrich A., Scrace G., Stroobant P., Waterfield M. D. (1984) *EMBO J.* 136, 921-928.

- Kaufman R. J. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82, 689-693.
- Kaufman R. J., Murtha P., and Davies M. V. (1987) EMBO J. 6, 187-193.
- 5 Kaufman R. J., Davies M. V., Wasley L. C., and Michnick D. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 4485-4490.
- 10 Kelly J. D., Raines E. W., Ross R., and Murray M. J. (1985) EMBO J. 4, 3399-3405.
- Klausner R. D. and Harford J. B. (1989) Science 246, 870-872.
- 15 Knoechel W., Korge E., Basner A., and Meyerhof W. (1986) J. Mol. Evol. 23, 211-223.
- Kozak M. (1987) Mol. Cell. Biol. 7 (10), 3438-3445.
- 20 Kozak M. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 5134-5142.
- La Rochelle W. J., Giese N., May-Siroff M., Robbins K. C., and Aaronson S. A. (1990) Science 248, 1541-1544.
- 25 La Rochelle W. J., May-Siroff M., Robbins K. C., and Aaronson S. A. (1991) Genes & Development 5, 1191-1199.
- Lehrach H., Diamond D., Wozney J. M., and Boedtke H. (1977) Biochemistry 16, 4743-4751.
- 30 Macejak D. G., and Sarnow P. (1991) Nature (London) 353, 90-94.
- Matoskova B., Rorsman F., Svensson V. and Betsholtz C. (1989), Mol. Cell. Biol. 9, 3148-3150.
- 35 Meerovitch K., Pelletier J., and Sonenberg N. (1989) Genes Dev. 3, 1026-1034.
- Millan, J.L. (1986) J. Biol. Chem. 261, 3112-3115
- 40 Nakamaye K. and Eckstein F. (1986) Nucl. Acids Res. 14, 9679-9698.
- Nister M., Hammacher A., Mellström K., Siegbahn A., Rönstrang L., Westermarck B., and Heldin C.-H. (1988); Cell 52, 791-799.
- 45 Östman A., Rall L., Hammacher A., Wormstead M. A., Coit D., Valenzuela P., Betsholtz C., Westermarck B., and Heldin C.-H. (1988) J. Biol. Chem. 263, 16202-16208.
- 50 Östman A., Andersson M., Betsholtz C., Westermarck B., and Heldin C.-H. (1991) Cell Regulation 2, 503-512.
- Patient R. K., Harris R., Walmsley M. E. and Williams J. G. (1983) J. Biol. Chem. 258, 8521-8523.

- Pelletier J., and Sonenberg N. (1988) *Nature* 334, 320.
- Purchio A. F. and Fareed G. C. (1979) *J. Virol.* 29, 763-769.
- 5 Ratner L., Josephs S. F., Jarrett R., Reitz M. S. and Wong-Staal F. (1985), *Nucl. Acids Res.* 13, 5007-5018.
- 10 Reilly C. F. and Broski J. E. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 1047-1054.
- Robbins K. C., Leal F., Pierce J. H., and Aaronson S. A. (1985) *EMBO J.* 4, 1783-1792.
- 15 Sachinidis A., Locher R., Vetter W., Tatje D., and Hoppe J. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 10238-10243.
- Sachinidis A., Locher R., Hoppe J., and Vetter W. (1990) *FEBS Lett.* 275, 95-98.
- 20 Sarnow P. (1989) *J. Virol.* 63, 467-470.
- Sayers J. R., Schmidt W. and Eckstein F. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16, 791-802.
- 25 Shipley G. D., Childes C. B., Volkenant M. E. and Moses H. I. (1984) *Cancer Res.* 44, 710-716.
- 30 Siegbahn A., Hammacher A., Westermark B., and Heldin C.-H. (1990) *J. Clin. Invest.* 85, 916-920.
- Simoes E. A. F., and Sarnow P. (1991) *J. Virol.* 65, 913-921.
- 35 Stroobant P., and Waterfield M. D. (1984) *EMBO J.* 3, 2963-2967.
- Taylor J. W., Ott J. and Eckstein F. (1985) *Nucl. Acids Res.* 13, 8764-8785.
- 40 Vara J., Portela A., Oritin J. and Jimenez A. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14, 4617-4624.
- Weich H. A., Sebald W., Schairer H. U., and Hoppe J. (1986), *FEBS Lett.* 198, 344-348.
- 45 Wigler M., Sweet R., Sim G. K., Wold B., Pellicer A., Lacy E., Maniatis T., Silverstein S., and Axel R. (1979) *Cell* 16, 777-785.
- 50 Wirth M., Bode J., Zettlmeißl G., and Hauser H. (1988) *Gene* 73, 419-426.
- Wirth M., Schumacher L., and Hauser H. (1991) In *Modern Approaches to Animal Cell Technology*, Griffiths B., Spier R., and Meigner R., eds. Butterworths), pp. 338-343.

- 43 -

Wise R. J., Orkin S. H. and Collins T. (1989) Nucl. Acids Res. 17, 6591-6601.

Wood C. R., Morris G. E., Alderman E. M., Fouser L., and Kaufman
5 R. J. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8006-8010.

Young R. M., Mendoza A. E., Collins T. and Orkin S. H. (1990)
Mol. Cell. Biol. 10, 6051-6054.

44
SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Beiersdorf AG
(B) STRASSE: Unnastr. 48
(C) ORT: Hamburg
(E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 20245

(A) NAME: GBF - Gesellschaft fuer Biotechnologische
Forschung mbH
(B) STRASSE: Mascheroder Weg 1
(C) ORT: Braunschweig
(E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 38124

(ii) ANMELDETITEL: Multicistronische Expressionseinheiten und
deren Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 25

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 748 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: pODA (Eichner et al., 1989)

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 95..682
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "PDGF-A Vorläufersequenz
(kurze Spliceform)"
/note= "humanes PDGF-A Gen (kurze Spliceform, [2])
aus pODA, flankiert von 5'-EcoRI und 3'-HindIII
Restriktionsschnittstellen"
/citation= ([2])

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) LAGE: 353..682
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "mature PDGF-A Kette"

45

(x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:

(A) AUTOREN: Eichner, W.
 Jaeger, V.
 Herbst, D.
 Hauser, H.
 Hoppe, J.

(C) ZEITSCHRIFT: Eur. J. Biochem.

(D) BAND: 185

(F) SEITEN: 135-140

(G) DATUM: 1989

(x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:

(A) AUTOREN: Hoppe, J.
 Schumacher, L.
 Eichner, W.
 Weich, H. A.

(C) ZEITSCHRIFT: FEBS Lett.

(D) BAND: 223

(F) SEITEN: 243-246

(G) DATUM: 1987

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAATTCACAC TGAATTCGC CGCCACAGGA GACCGGCTGG AGCGCCCGCC CCGCGCCTCG	60
CCTCTCCTCC GAGCAGCCAG CGCCTCGGGA CGCG ATG AGG ACC TTG GCT TGC	112
Met Arg Thr Leu Ala Cys	
-86 -85	
CTG CTG CTC CTC GGC TGC GGA TAC CTC GCC CAT GTT CTG GCC GAG GAA	160
Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala His Val Leu Ala Glu Glu	
-80 -75 -70 -65	
GCC GAG ATC CCC CGC GAG GTG ATC GAG AGG CTG GCC CGC AGT CAG ATC	208
Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg Leu Ala Arg Ser Gln Ile	
-60 -55 -50	
CAC AGC ATC CGG GAC CTC CAG CGA CTC CTG GAG ATA GAC TCC GTA GGG	256
His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu Glu Ile Asp Ser Val Gly	
-45 -40 -35	
AGT GAG GAT TCT TTG GAC ACC AGC CTG AGA GCT CAC GGG GTC CAC GCC	304
Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg Ala His Gly Val His Ala	
-30 -25 -20	
ACT AAG CAT GTG CCC GAG AAG CGG CCC CTG CCC ATT CGG AGG AAG AGA	352
Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu Pro Ile Arg Arg Lys Arg	
-15 -10 -5	
AGC ATC GAG GAA GCT GTC CCC GCT GTC TGC AAG ACC AGG ACG GTC ATT	400
Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys Lys Thr Arg Thr Val Ile	
1 5 10 15	
TAC GAG ATT CCT CGG AGT CAG GTC GAC CCC ACG TCC GCC AAC TTC CTG	448
Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro Thr Ser Ala Asn Phe Leu	
20 25 30	
ATC TGG CCC CCG TGC GTG GAG GTG AAA CGC TGC ACC GGC TGC TGC AAC	496
Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys Cys Asn	
35 40 45	
ACG AGC AGT GTC AAG TGC CAG CCC TCC CGC GTC CAC CAC CGC AGC GTC	544
Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg Val His His Arg Ser Val	
50 55 60	

46

AAG GTG GCC AAG GTG GAA TAC GTC AGG AAG AAG CCA AAA TTA AAA GAA	592
Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Lys Pro Lys Leu Lys Glu	
65 70 75 80	
GTC CAG GTG AGG TTA GAG GAG CAT TTG GAG TGC GCC TGC GCG ACC ACA	640
Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu Cys Ala Cys Ala Thr Thr	
85 90 95	
AGC CTG AAT CCG GAT TAT CGG GAA GAG GAC ACG GAT GTG AGG	682
Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp Thr Asp Val Arg	
100 105 110	
TGAGGATGAG CCGCAGCCCT TTCCTGGGAC ATGGATGTGG GGATCCGTCG ACCTGCAGCC	742
AAGCTT	748

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 196 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala	
-86 -85 -80 -75	
His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg	
-70 -65 -60 -55	
Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu	
-50 -45 -40	
Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg	
-35 -30 -25	
Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu	
-20 -15 -10	
Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys	
-5 1 5 10	
Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro	
15 20 25	
Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg	
30 35 40	
Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg	
45 50 55	
Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys	
60 65 70	
Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu	
75 80 85 90	

- 47 -

Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp
95 100 105

Thr Asp Val Arg
110

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 868 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pMVW-2 (Weich et al., 1986)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 40..762
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "PDGF-B
Vorläufersequenz"
/note= "humanes PDGF-B Gen aus pGEM2-PDGF-B,
flankiert von 5'-EcoRI und 3'-HindIII
Restriktionsschnittstellen"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) LAGE: 283..609
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "mature PDGF-B Kette"

(x) VERÖFFENTLICHUNGSGRUNDGEGENSTÄND:

- (A) AUTOREN: Weich, H. A.
Sebald, W.
Schairer, H. U.
Hoppe, U.
(C) ZEITSCHRIFT: FEBS Lett.
(D) BAND: 198
(F) SEITEN: 344-348
(G) DATUM: 1986

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GAATTCGAGC TCGCCCGGGG ATCCTCTAGA GTCGACACC ATG AAT CGC TGC TGG 54
Met Asn Arg Cys Trp
-81 -80

CGC CTC TTC CTG TCT CTC TGC TGC TAC CTG CGT CTG GTC AGC GCC GAG 102
Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg Leu Val Ser Ala Glu
-75 -70 -65

GGG GAC CCC ATT CCC GAG GAG CTT TAT GAG ATG CTG AGT GAT CAC TCG 150
Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met Leu Ser Asp His Ser
-60 -55 -50 -45

48

[illegible]

49

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 241 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg
 -81 -80 -75 -70
 Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met
 -65 -60 -55 -50
 Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu
 -45 -40 -35
 His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met
 -30 -25 -20
 Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg
 -15 -10 -5
 Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu
 1 5 10 15
 Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp
 20 25 30
 Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln
 35 40 45
 Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr
 50 55 60
 Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg
 65 70 75
 Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu
 80 85 90 95
 Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser
 100 105 110
 Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val
 115 120 125
 Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg
 130 135 140
 Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly
 145 150 155
 Ala
 160

50

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 628 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Poliovirus Typ 1 (Mahoney strain)

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pGEM3-5'Polio (M) (4708 bp), (Sarnow, 1989)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..628
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "abgebildet sind die ersten 628 nt der 5' nicht-translatierten Region des Poliovirus Typ 1 (Mahoney)"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 610
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "nicht-authentische Sequenz auf Grund einer Basenpaarsubstitution von C nach G an der Position 610"

(x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:

- (A) AUTOREN: Sarnow, P.
- (C) ZEITSCHRIFT: J. Virol.
- (D) BAND: 63
- (F) SEITEN: 467-470
- (G) DATUM: 1989

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TTAAAACAGC TCTGGGGTTG TACCCACCCC AGAGGCCAC GTGGCGGCTA GTACTCCGGT	60
ATTGCGGTAC CCTTGTACGC CTGTTTTATA CTCCCTTCCC GTAACCTAGA CGCACAAAAC	120
CAAGTTCAAT AGAAGGGGGT ACAAACCAGT ACCACCACGA ACAAGCACTT CTGTTTCCCC	180
GGTGATGTCG TATAGACTGC TTGCGTGGTT GAAAGCGACG GATCCGTTAT CCGCTTATGT	240
ACTTCGAGAA GCCCAGTACC ACCTCGGAAT CTTGATGCG TTGCGCTCAG CACTCAACCC	300
CAGAGTGTAG CTTAGGCTGA TGAGTCTGGA CATCCCTCAC CGGTGACGGT GGTCCAGGCT	360
GCGTTGGCGG CCTACCTATG GCTAACGCCA TGGGACGCTA GTTGTGAACA AGGTGTGAAG	420
AGCCTATTGA GCTACATAAG AATCCTCCGG CCCCTGAATG CGGCTAATCC CAACCTCGGA	480
GCAGGTGGTC ACAAACCAGT GATTGGCCTG TCGTAACGCG CAAGTCCGTG GCGGAACCGA	540
CTACTTTGGG TGTCCGTGTT TCCTTTTATT TTATTGTGGC TGCTTATGGT GACAATCACA	600
GATTGTTATG ATAAAGCGAA TTGGATTG	628

51

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 55 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Xenopus laevis* (Falcone & Andrews; Patient et al.)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄGE: 12..55
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "beta-Globin Homologie; partielle Sequenz, flankiert v. Restriktionsschnittstellen."

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄGE: 12..55
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Die 5'-3'-Orientierung gilt f. Insertion zwischen Polio-UTR und Cistron 2 der bicistronischen Vektoren"

(x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:

- (A) AUTOREN: Falcone, D.
Andrews, D. W.
- (C) ZEITSCHRIFT: Mol. Cell. Biol.
- (D) BAND: 11
- (E) AUSGABE: 5
- (F) SEITEN: 2656-2664
- (G) DATUM: 1991

(x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:

- (A) AUTOREN: Patient, R. K.
Harris, R.
Walmsley, M. E.
Williams, J. G.
- (C) ZEITSCHRIFT: J. Biol. Chem.
- (D) BAND: 258
- (F) SEITEN: 8521-8523
- (G) DATUM: 1983

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GGCCGTCGAC GCTTGTTCTT TTTGCAGAAG CTCAGAATAA ACGCTCAACT TTGGC

55

52

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 17 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
(B) LÄGE: 1..17
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= M1317MER
/note= "synthetische DNA; M13 Sequenzierprimer
(New England Biolabs GmbH), eingesetzt fuer PCR"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GTAAAACGAC GGCCAGT

17

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
(B) LÄGE: 1..24
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= M1324MER
/note= "synthetische DNA; M13 reverser
Sequenzierprimer (New England Biolabs GmbH),
eingesetzt fuer PCR"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

AGCGGATAAC AATTTACAC AGGA

24

53

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄGE: 1..19
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= NCCLSA1
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker zur
Umklonierung des verkuerzten PDGF-B Vorlauefers
aus pMVW-2 in den Bakteriophagen M13mpl9"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CATGGCCCAA TCGATCCCG

19

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄGE: 1..19
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= NCCLSA2
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker zur
Umklonierung des verkuerzten PDGF-B Vorlauefers
aus pMVW-2 in den Bakteriophagen M13mpl9"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

TCGACGGGAT CGATTGGGC

19

54

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..37
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= PDGBBCL
/note= "synthetische DNA; Mutageneseprimer zur
Einfuehrung einer BclI-Schnittstelle in den
5'-Bereich des PDGF-B Vorlauefers"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GCTTTATGAG ATGCTGAGTG ATCACTCGAT CCGCTCC

37

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 110 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..110
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= PPDGFB1
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker zur
Rekonstitution der maturen PDGF-B
Vorlaefersequenz"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

TCGACACCAT GAATCGCTGC TGGGCGCTCT TCCTGTCTCT CTGCTGCTAC CTGCGTCTGG

60

TCAGCGCCGA GGGGGACCCC ATTCCCGAGG AGCTTTATGA GATGCTGAGT

110

55

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 110 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..110
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= PPDGFB2
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker zur
Rekonstitution der maturen PDGF-B
Vorläufersequenz"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

GATCACTCAG CATCTCATAA AGCTCCTCGG GAATGGGGTC CCCCTCGGCG CTGACCAGAC 60
GCAGGTAGCA GCAGAGAGAC AGGAAGAGCG CCCAGCAGCG ATTCATGGTG 110

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..30
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= 5'-POLIO1
/note= "synthetische DNA; synthetischer
PCR-Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

TTTCTGCAGA AGCTTAAAAC AGCTCTGGGG 30

56

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..28
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= 3'-POLIO2
/note= "synthetische DNA; synthetischer
PCR-Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

TTGCGGCCGC AATCCAATTC GCTTTATC

28

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..13
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= E-N-E1
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

AATTGCGGCC GCG

13

57

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 13 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
(B) LÄGE: 1..13
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= E-N-E2
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

AATTCGCGGC CGC

13

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 18:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
(B) LÄGE: 1..16
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= PDGFB190-PRIMI
/note= "synthetische DNA; synthetischer
PCR-Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

GAATTCGAGC TCGCCCGGG

19

58

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄGE: 1..37
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= PDGFB190-PRIMII
/note= "synthetische DNA; synthetischer
PCR-Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

CCCGGGAAGC TTCCGGTTAT CAGGTCACAG GCCGTGC

37

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1956 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pSQ2-SEAP (Berger et al., 1988)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄGE: 43..1560
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "humanes SEAP-Gen; flankiert
von 5'-EcoRI und 3'-HindIII
Restriktionsschnittstellen"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LÄGE: 94..1560
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "matures Protein"

(x) VERÖFFENTLICHUNGSGEWINNUNG:

- (A) AUTOREN: Berger, J.
Hauber, J.
Hauber, R.
Geiger, R.
Cullen, B. R.
- (C) ZEITSCHRIFT: Gene
- (D) BAND: 66
- (F) SEITEN: 1-10
- (G) DATUM: 1988

59

(x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:

(A) AUTOREN: Millan, J. L.
 (C) ZEITSCHRIFT: J. Biol. Chem.
 (D) BAND: 261
 (F) SEITEN: 3112-3115
 (G) DATUM: 1986

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

GAATTCGAGC TCGCCCGGGG ATCCTCTAGA GTCAGCTTCT GC	ATG CTG CTG CTG	54
	Met Leu Leu Leu	
	-17 -15	
CTG CTG CTG CTG GGC CTG AGG CTA CAG CTC TCC CTG GGC ATC ATC CCA		102
Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu Gly Ile Ile Pro		
	-10 -5 1	
GTT GAG GAG GAG AAC CCG GAC TTC TGG AAC CGC GAG GCA GCC GAG GCC		150
Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn Arg Glu Ala Ala Glu Ala		
	5 10 15	
CTG GGT GCC GCC AAG AAG CTG CAG CCT GCA CAG ACA GCC GCC AAG AAC		198
Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala Gln Thr Ala Ala Lys Asn		
	20 25 30 35	
CTC ATC ATC TTC CTG GGC GAT GGG ATG GGG GTG TCT ACG GTG ACA GCT		246
Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser Thr Val Thr Ala		
	40 45 50	
GCC AGG ATC CTA AAA GGG CAG AAG AAG GAC AAA CTG GGG CCT GAG ATA		294
Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu Gly Pro Glu Ile		
	55 60 65	
CCC CTG GCC ATG GAC CGC TTC CCA TAT GTG GCT CTG TCC AAG ACA TAC		342
Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val Ala Leu Ser Lys Thr Tyr		
	70 75 80	
AAT GTA GAC AAA CAT GTG CCA GAC AGT GGA GCC ACA GCC ACG GCC TAC		390
Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr Ala Thr Ala Tyr		
	85 90 95	
CTG TGC GGG GTC AAG GGC AAC TTC CAG ACC ATT GGC TTG AGT GCA GCC		438
Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly Leu Ser Ala Ala		
	100 105 110 115	
GCC CGC TTT AAC CAG TGC AAC ACG ACA CGC GGC AAC GAG GTC ATC TCC		486
Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn Glu Val Ile Ser		
	120 125 130	
GTG ATG AAT CGG GCC AAG AAA GCA GGG AAG TCA GTG GGA GTG GTA ACC		534
Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val Gly Val Val Thr		
	135 140 145	
ACC ACA CGA GTG CAG CAC GCC TCG CCA GCC GGC ACC TAC GCC CAC ACG		582
Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Thr Tyr Ala His Thr		
	150 155 160	
GTG AAC CGC AAC TGG TAC TCG GAC GCC GAC GTG CCT GCC TCG GCC CGC		630
Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro Ala Ser Ala Arg		
	165 170 175	
CAG GAG GGC TGC CAG GAC ATC GCT ACG CAG CTC ATC TCC AAC ATG GAC		678
Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile Ser Asn Met Asp		
	180 185 190 195	

60

ATT Ile	GAC Asp	GTG Val	ATC Ile	CTA Leu 200	GGT Gly	GGA Gly	GGC Gly	CGA Arg	AAG Lys 205	TAC Tyr	ATG Met	TTT Phe	CCC Pro	ATG Met 210	GGA Gly	726
ACC Thr	CCA Pro	GAC Asp	CCT Pro 215	GAG Glu	TAC Tyr	CCA Pro	GAT Asp	GAC Asp 220	TAC Tyr	AGC Ser	CAA Gln	GGT Gly	GGG Gly 225	ACC Thr	AGG Arg	774
CTG Leu	GAC Asp	GGG Gly 230	AAG Lys	AAT Asn	CTG Leu	GTG Val	CAG Gln 235	GAA Glu	TGG Trp	CTG Leu	GCG Ala	AAG Lys 240	CGC Arg	CAG Gln	GGT Gly	822
GCC Ala 245	CGG Arg	TAT Tyr	GTG Val	TGG Trp	AAC Asn	CGC Arg 250	ACT Thr	GAG Glu	CTC Leu	ATG Met	CAG Gln 255	GCT Ala	TCC Ser	CTG Leu	GAC Asp	870
CCG Pro 260	TCT Ser	GTG Val	ACC Thr	CAT His	CTC Leu 265	ATG Met	GGT Gly	CTC Leu	TTT Phe 270	GAG Glu	CCT Pro	GGA Gly	GAC Asp	ATG Met	AAA Lys 275	918
TAC Tyr	GAG Glu	ATC Ile	CAC His	CGA Arg 280	GAC Asp	TCC Ser	ACA Thr	CTG Leu	GAC Asp 285	CCC Pro	TCC Ser	CTG Leu	ATG Met	GAG Glu 290	ATG Met	966
ACA Thr	GAG Glu	GCT Ala	GCC Ala 295	CTG Leu	CGC Arg	CTG Leu	CTG Leu	AGC Ser 300	AGG Arg	AAC Asn	CCC Pro	CGC Arg	GGC Gly 305	TTC Phe	TTC Phe	1014
CTC Leu	TTC Phe	GTG Val 310	GAG Glu	GGT Gly	GGT Gly	CGC Arg	ATC Ile 315	GAC Asp	CAT His	GGT Gly	CAT His	CAT His 320	GAA Glu	AGC Ser	AGG Arg	1062
GCT Ala 325	TAC Tyr	CGG Arg	GCA Ala	CTG Leu	ACT Thr	GAG Glu 330	ACG Thr	ATC Ile	ATG Met	TTC Phe	GAC Asp 335	GAC Asp	GCC Ala	ATT Ile	GAG Glu	1110
AGG Arg 340	GCG Ala	GGC Gly	CAG Gln	CTC Leu	ACC Thr 345	AGC Ser	GAG Glu	GAG Glu	GAC Asp 350	ACG Thr 350	CTG Leu	AGC Ser	CTC Leu	GTC Val	ACT Thr 355	1158
GCC Ala	GAC Asp	CAC His	TCC Ser	CAC His 360	GTC Val	TTC Phe	TCC Ser	TTC Phe	GGA Gly 365	GGC Gly	TAC Tyr	CCC Pro	CTG Leu	CGA Arg 370	GGG Gly	1206
AGC Ser	TCC Ser	ATC Ile	TTC Phe 375	GGG Gly	CTG Leu	GCC Ala	CCT Pro	GGC Gly 380	AAG Lys	GCC Ala	CGG Arg	GAC Asp	AGG Arg 385	AAG Lys	GCC Ala	1254
TAC Tyr	ACG Thr	GTC Val 390	CTC Leu	CTA Leu	TAC Tyr	GGA Gly	AAC Asn 395	GGT Gly	CCA Pro	GGC Gly	TAT Tyr	GTG Val 400	CTC Leu	AAG Lys	GAC Asp	1302
GGC Gly 405	GCC Ala	CGG Arg	CCG Pro	GAT Asp	GTT Val	ACC Thr 410	GAG Glu	AGC Ser	GAG Glu	AGC Ser	GGG Gly 415	AGC Ser	CCC Pro	GAG Glu	TAT Tyr	1350
CGG Arg 420	CAG Gln	CAG Gln	TCA Ser	GCA Ala	GTG Val 425	CCC Pro	CTG Leu	GAC Asp	GAA Glu 430	GAG Glu	ACC Thr	CAC His	GCA Ala	GGC Gly	GAG Glu 435	1398
GAC Asp	GTG Val	GCG Ala	GTG Val	TTC Phe 440	GCG Ala	CGC Arg	GGC Gly	CCG Pro	CAG Gln 445	GCG Ala	CAC His	CTG Leu	GTT Val	CAC His	GGC Gly 450	1446

61

GTG CAG GAG CAG ACC TTC ATA GCG CAC GTC ATG GCC TTC GCC GCC TGC 1494
 Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala Phe Ala Ala Cys
 455 460 465
 CTG GAG CCC TAC ACC GCC TGC GAC CTG GCG CCC CCC GCC GGC ACC ACC 1542
 Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro Pro Ala Gly Thr Thr
 470 475 480
 GAC GCC GCG CAC CCG GGT TAACCCGTGG TCCCCGCGTT GCTTCCTCTG 1590
 Asp Ala Ala His Pro Gly
 485
 CTGGCCGGGA CCCTGCTGCT GCTGGAGACG GCCACTGCTC CCTGAGTGTC CCGTCCCTGG 1650
 GGCTCCTGCT TCCCCATCCC GGAGTTCTCC TGCTCCCCAC CTCCTGTCGT CCTGCCTGGC 1710
 CTCCAGCCCG AGTCGTCATC CCCGGAGTCC CTATACAGAG GTCCTGCCAT GGAACCTTCC 1770
 CCTCCCCGTG CGCTCTGGGG ACTGAGCCCA TGACACCAAA CCTGCCCCTT GGCTGCTCTC 1830
 GGACTCCCTA CCCC AACCCC AGGGACTGCA GGTGTGCCCC TGTGGCTGCC TGCACCCAG 1890
 GAAAGGAGGG GGCTCAGGCC ATCCAGCCAC CACCTACAGC CCAGTGGCCT CGAGCTGCAG 1950
 AAGCTT 1956

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 506 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu
 -17 -15 -10 -5
 Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn Arg Glu
 1 5 10 15
 Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala Gln Thr
 20 25 30
 Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser
 35 40 45
 Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu
 50 55 60
 Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val Ala Leu
 65 70 75
 Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr
 80 85 90 95
 Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly
 100 105 110

62

Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn
 115 120 125
 Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val
 130 135 140
 Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Thr
 145 150 155
 Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro
 160 165 170 175
 Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile
 180 185 190
 Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met
 195 200 205
 Phe Pro Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln
 210 215 220
 Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp Leu Ala
 225 230 235
 Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Met Gln
 240 245 250 255
 Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro
 260 265 270
 Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser
 275 280 285
 Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg Asn Pro
 290 295 300
 Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His
 305 310 315
 His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met Phe Asp
 320 325 330 335
 Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu
 340 345 350
 Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr
 355 360 365
 Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg
 370 375 380
 Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr
 385 390 395
 Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly
 400 405 410 415
 Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr
 420 425 430
 His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His
 435 440 445

63

Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala
 450 455 460

Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro Pro
 465 470 475

Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly
 480 485

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 22:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 1811 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzel
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Feuerfliege (Photinus pyralis)
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
 - (B) CLON: pRSVLUC (de Wet et al., 1987)
- (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LÄNGE: 94..1743
 - (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "codierende Region des Luciferase-Gens; flankiert von 5'-SmaI und 3'-HindIII Restriktionsschnittstellen"
- (x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:
 - (A) AUTOREN: de Wet, J. R.
 Wood, K. V.
 DeLuca, M.
 Helinski, D. R.
 Subramani, S.
 - (C) ZEITSCHRIFT: Mol. Cell. Biol.
 - (D) BAND: 7
 - (F) SEITEN: 725-737
 - (G) DATUM: 1987

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

CCCCGGGATC CTCTAGAGTC AGCTTGAATT CCTTTGTGTT ACATTCTTGA ATGTCGCTCG	60
CAGTGACATT AGCATTCCGG TACTGTTGGT AAA ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA	114
Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile	
1 5	
AAG AAA GGC CCG GCG CCA TTC TAT CCT CTA GAG GAT GGA ACC GCT GGA	162
Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly	
10 15 20	

64

GAG Glu	CAA Gln	CTG Leu	CAT His	AAG Lys	GCT Ala	ATG Met	AAG Lys	AGA Arg	TAC Tyr	GCC Ala	CTG Leu	GTT Val	CCT Pro	GGA Gly	ACA Thr	210
	25					30					35					
ATT Ile	GCT Ala	TTT Phe	ACA Thr	GAT Asp	GCA Ala	CAT His	ATC Ile	GAG Glu	GTG Val	AAC Asn	ATC Ile	ACG Thr	TAC Tyr	GCG Ala	GAA Glu	258
	40				45					50					55	
TAC Tyr	TTC Phe	GAA Glu	ATG Met	TCC Ser	GTT Val	CGG Arg	TTG Leu	GCA Ala	GAA Glu	GCT Ala	ATG Met	AAA Lys	CGA Arg	TAT Tyr	GGG Gly	306
				60					65					70		
CTG Leu	AAT Asn	ACA Thr	AAT Asn	CAC His	AGA Arg	ATC Ile	GTC Val	GTA Val	TGC Cys	AGT Ser	GAA Glu	AAC Asn	TCT Ser	CTT Leu	CAA Gln	354
			75					80					85			
TTC Phe	TTT Phe	ATG Met	CCG Pro	GTG Val	TTG Leu	GGC Gly	GCG Ala	TTA Leu	TTT Phe	ATC Ile	GGA Gly	GTT Val	GCA Ala	GTT Val	GCG Ala	402
		90					95					100				
CCC Pro	GCG Ala	AAC Asn	GAC Asp	ATT Ile	TAT Tyr	AAT Asn	GAA Glu	CGT Arg	GAA Glu	TTG Leu	CTC Leu	AAC Asn	AGT Ser	ATG Met	AAC Asn	450
	105					110					115					
ATT Ile	TCG Ser	CAG Gln	CCT Pro	ACC Thr	GTA Val	GTG Val	TTT Phe	GTT Val	TCC Ser	AAA Lys	AAG Lys	GGG Gly	TTG Leu	CAA Gln	AAA Lys	498
	120				125					130					135	
ATT Ile	TTG Leu	AAC Asn	GTG Val	CAA Gln	AAA Lys	AAA Lys	TTA Leu	CCA Pro	ATA Ile	ATC Ile	CAG Gln	AAA Lys	ATT Ile	ATT Ile	ATC Ile	546
				140					145					150		
ATG Met	GAT Asp	TCT Ser	AAA Lys	ACG Thr	GAT Asp	TAC Tyr	CAG Gln	GGA Gly	TTT Phe	CAG Gln	TCG Ser	ATG Met	TAC Tyr	ACG Thr	TTC Phe	594
			155					160					165			
GTC Val	ACA Thr	TCT Ser	CAT His	CTA Leu	CCT Pro	CCC Pro	GGT Gly	TTT Phe	AAT Asn	GAA Glu	TAC Tyr	GAT Asp	TTT Phe	GTA Val	CCA Pro	642
		170					175					180				
GAG Glu	TCC Ser	TTT Phe	GAT Asp	CGT Arg	GAC Asp	AAA Lys	ACA Thr	ATT Ile	GCA Ala	CTG Leu	ATA Ile	ATG Met	AAT Asn	TCC Ser	TCT Ser	690
	185					190					195					
GGA Gly	TCT Ser	ACT Thr	GGG Gly	TTA Leu	CCT Pro	AAG Lys	GGT Gly	GTG Val	GCC Ala	CTT Leu	CCG Pro	CAT His	AGA Arg	ACT Thr	GCC Ala	738
	200				205					210					215	
TGC Cys	GTC Val	AGA Arg	TTC Phe	TCG Ser	CAT His	GCC Ala	AGA Arg	GAT Asp	CCT Pro	ATT Ile	TTT Phe	GGC Gly	AAT Asn	CAA Gln	ATC Ile	786
				220					225					230		
ATT Ile	CCG Pro	GAT Asp	ACT Thr	GCG Ala	ATT Ile	TTA Leu	AGT Ser	GTT Val	GTT Val	CCA Pro	TTC Phe	CAT His	CAC His	GGT Gly	TTT Phe	834
			235					240					245			
GGA Gly	ATG Met	TTT Phe	ACT Thr	ACA Thr	CTC Leu	GGA Gly	TAT Tyr	TTG Leu	ATA Ile	TGT Cys	GGA Gly	TTT Phe	CGA Arg	GTC Val	GTC Val	882
		250					255					260				
TTA Leu	ATG Met	TAT Tyr	AGA Arg	TTT Phe	GAA Glu	GAA Glu	GAG Glu	CTG Leu	TTT Phe	TTA Leu	CGA Arg	TCC Ser	CTT Leu	CAG Gln	GAT Asp	930
	265					270					275					

65

TAC Tyr 280	AAA Lys	ATT Ile	CAA Gln	AGT Ser	GCG Ala 285	TTG Leu	CTA Leu	GTA Val	CCA Pro	ACC Thr 290	CTA Leu	TTT Phe	TCA Ser	TTC Phe	TTC Phe 295	978
GCC Ala	AAA Lys	AGC Ser	ACT Thr	CTG Leu 300	ATT Ile	GAC Asp	AAA Lys	TAC Tyr	GAT Asp 305	TTA Leu	TCT Ser	AAT Asn	TTA Leu	CAC His 310	GAA Glu	1026
ATT Ile	GCT Ala	TCT Ser	GGG Gly 315	GGC Gly	GCA Ala	CCT Pro	CTT Leu	TCG Ser 320	AAA Lys	GAA Glu	GTC Val	GGG Gly 325	GAA Glu	GCG Ala	GTT Val	1074
GCA Ala	AAA Lys	CGC Arg 330	TTC Phe	CAT His	CTT Leu	CCA Pro	GGG Gly 335	ATA Ile	CGA Arg	CAA Gln	GGA Gly	TAT Tyr 340	GGG Gly	CTC Leu	ACT Thr	1122
GAG Glu	ACT Thr 345	ACA Thr	TCA Ser	GCT Ala	ATT Ile	CTG Leu 350	ATT Ile	ACA Thr	CCC Pro	GAG Glu	GGG Gly 355	GAT Asp	GAT Asp	AAA Lys	CCG Pro	1170
GGC Gly 360	GCG Ala	GTC Val	GGT Gly	AAA Lys	GTT Val 365	GTT Val	CCA Pro	TTT Phe	TTT Phe	GAA Glu 370	GCG Ala	AAG Lys	GTT Val	GTG Val	GAT Asp 375	1218
CTG Leu	GAT Asp	ACC Thr	GGG Gly	AAA Lys 380	ACG Thr	CTG Leu	GGC Gly	GTT Val	AAT Asn 385	CAG Gln	AGA Arg	GGC Gly	GAA Glu	TTA Leu 390	TGT Cys	1266
GTC Val	AGA Arg	GGA Gly	CCT Pro 395	ATG Met	ATT Ile	ATG Met	TCC Ser	GGT Gly 400	TAT Tyr	GTA Val	AAC Asn	AAT Asn	CCG Pro	GAA Glu	GCG Ala	1314
ACC Thr	AAC Asn	GCC Ala 410	TTG Leu	ATT Ile	GAC Asp	AAG Lys	GAT Asp 415	GGA Gly	TGG Trp	CTA Leu	CAT His	TCT Ser 420	GGA Gly	GAC Asp	ATA Ile	1362
GCT Ala	TAC Tyr 425	TGG Trp	GAC Asp	GAA Glu	GAC Asp	GAA Glu 430	CAC His	TTC Phe	TTC Phe	ATA Ile	GTT Val 435	GAC Asp	CGC Arg	TTG Leu	AAG Lys	1410
TCT Ser 440	TTA Leu	ATT Ile	AAA Lys	TAC Tyr	AAA Lys 445	GGA Gly	TAT Tyr	CAG Gln	GTG Val	GCC Ala 450	CCC Pro	GCT Ala	GAA Glu	TTG Leu 455	GAA Glu	1458
TCG Ser	ATA Ile	TTG Leu	TTA Leu	CAA His 460	CAC His	CCC Pro	AAC Asn	ATC Ile	TTC Phe 465	GAC Asp	GCG Ala	GGC Gly	GTG Val	GCA Ala 470	GGT Gly	1506
CTT Leu	CCC Pro	GAC Asp 475	GAT Asp	GAC Asp	GCC Ala	GGT Gly	GAA Glu 480	CTT Leu	CCC Pro	GCC Ala	GCC Ala	GTT Val 485	GTT Val	GTT Val	TTG Leu	1554
GAG Glu	CAC His	GGA Gly 490	AAG Lys	ACG Thr	ATG Met	ACG Thr	GAA Glu 495	AAA Lys	GAG Glu	ATC Ile	GTG Val	GAT Asp 500	TAC Tyr	GTC Val	GCC Ala	1602
AGT Ser	CAA Gln 505	GTA Val	ACA Thr	ACC Thr	GCG Ala	AAA Lys 510	AAG Lys	TTG Leu	CGC Arg	GGA Gly 515	GGA Gly	GTT Val	GTG Val	TTT Phe	GTG Val	1650
GAC Asp 520	GAA Glu	GTA Val	CCG Pro	AAA Lys	GGT Gly 525	CTT Leu	ACC Thr	GGA Gly	AAA Lys	CTC Leu 530	GAC Asp	GCA Ala	AGA Arg	AAA Lys	ATC Ile 535	1698

66

AGA GAG ATC CTC ATA AAG GCC AAG AAG GGC GGA AAG TCC AAA TTG 1743
 Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys Gly Gly Lys Ser Lys Leu
 540 545 550

TAAAATGTAA CTGTATTTCAG CGATGACGAA ATTCTTAGCT ATTGTAATAG CTGCAGGCAT 1803

GCAAGCTT 1811

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 550 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro
 1 5 10 15

Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys Arg
 20 25 30

Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu
 35 40 45

Val Asn Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr Phe Glu Met Ser Val Arg Leu Ala
 50 55 60

Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu Asn Thr Asn His Arg Ile Val Val
 65 70 75 80

Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Leu Gly Ala Leu
 85 90 95

Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg
 100 105 110

Glu Leu Leu Asn Ser Met Asn Ile Ser Gln Pro Thr Val Val Phe Val
 115 120 125

Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu Pro
 130 135 140

Ile Ile Gln Lys Ile Ile Ile Met Asp Ser Lys Thr Asp Tyr Gln Gly
 145 150 155 160

Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe
 165 170 175

Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile
 180 185 190

Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val
 195 200 205

Ala Leu Pro His Arg Thr Ala Cys Val Arg Phe Ser His Ala Arg Asp
 210 215 220

67

Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu Ser Val
 225 230 235 240
 Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu
 245 250 255
 Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu Glu Leu
 260 265 270
 Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu Val
 275 280 285
 Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys Tyr
 290 295 300
 Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser
 305 310 315 320
 Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile
 325 330 335
 Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr
 340 345 350
 Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe
 355 360 365
 Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val
 370 375 380
 Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly
 385 390 395 400
 Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly
 405 410 415
 Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe
 420 425 430
 Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln
 435 440 445
 Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile
 450 455 460
 Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu
 465 470 475 480
 Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys
 485 490 495
 Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu
 500 505 510
 Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly
 515 520 525
 Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys
 530 535 540
 Gly Gly Lys Ser Lys Leu
 545 550

68

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 24:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 625 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
 (B) CLON: pSBC-1/-2-PDGF-B
- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LÄNGE: 40..609
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "PDGF-B
 Vorläufersequenz"
- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 (B) LÄNGE: 283..609
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "mature PDGF-B Kette"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

GAATTCGAGC TCGCCCGGGG ATCCTCTAGA GTCGACACC ATG AAT CGC TGC TGG	54
Met Asn Arg Cys Trp	
-81 -80	
GCG CTC TTC CTG TCT CTC TGC TGC TAC CTG CGT CTG GTC AGC GCC GAG	102
Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Tyr Leu Arg Leu Val Ser Ala Glu	
-75 -70 -65	
GGG GAC CCC ATT CCC GAG GAG CTT TAT GAG ATG CTG AGT GAT CAC TCG	150
Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met Leu Ser Asp His Ser	
-60 -55 -50 -45	
ATC CGC TCC TTT GAT GAT CTC CAA CGC CTG CTG CAC GGA GAC CCC GGA	198
Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu His Gly Asp Pro Gly	
-40 -35 -30	
GAG GAA GAT GGG GCC GAG TTG GAC CTG AAC ATG ACC CGC TCC CAC TCT	246
Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met Thr Arg Ser His Ser	
-25 -20 -15	
GGA GGC GAG CTG GAG AGC TTG GCT CGT GGA AGA AGG AGC CTG GGT TCC	294
Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg Arg Ser Leu Gly Ser	
-10 -5 1	
CTG ACC ATT GCT GAG CCG GCC ATG ATC GCC GAG TGC AAG ACG CGC ACC	342
Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu Cys Lys Thr Arg Thr	
5 10 15 20	
GAG GTG TTC GAG ATC TCC CGG CGC CTC ATA GAC CGC ACC AAC GCC AAC	390
Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp Arg Thr Asn Ala Asn	
25 30 35	

69

TTC CTG GTG TGG CCG CCC TGT GTG GAG GTG CAG CGC TGC TCC GGC TGC	438
Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln Arg Cys Ser Gly Cys	
40 45 50	
TGC AAC AAC CGC AAC GTG CAG TGC CGC CCC ACC CAG GTG CAG CTG CGA	486
Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr Gln Val Gln Leu Arg	
55 60 65	
CCT GTC CAG GTG AGA AAG ATC GAG ATT GTG CGG AAG AAG CCA ATC TTT	534
Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro Ile Phe	
70 75 80	
AAG AAG GCC ACG GTG ACG CTG GAA GAC CAC CTG GCA TGC AAG TGT GAG	582
Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu Ala Cys Lys Cys Glu	
85 90 95 100	
ACA GTG GCA GCT GCA CGG CCT GTG ACC TGATAACCGG AACGTT	625
Thr Val Ala Ala Arg Pro Val Thr	
105	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 25:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 190 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg	
-81 -80 -75 -70	
Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met	
-65 -60 -55 -50	
Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu	
-45 -40 -35	
His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met	
-30 -25 -20	
Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg	
-15 -10 -5	
Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu	
1 5 10 15	
Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp	
20 25 30	
Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln	
35 40 45	
Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr	
50 55 60	
Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg	
65 70 75	

70

Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu
80 85 90 95

Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr
100 105

71

Patentansprüche

1. Multicistronische Expressionseinheit zur äquimolaren Expression von Polypeptiden oder Untereinheiten derselben in Säugerzellen als Wirtszellen, gekennzeichnet durch die allgemeine Formel

$$p - 5'UTR - C_1 - (IRES - Y - C_2)_n - 3'UTR - polyA,$$

in der

"p" ein transkriptionaler Promotor ist,

"5'UTR" eine nicht translatierte Nukleotidsequenz ist,

n 1, 2 oder 3 ist,

"C₁" und "C₂" Cistrons sind, welche jeweils ein für ein Polypeptid oder dessen Untereinheit kodierendes Gen enthalten, wobei dann, wenn n 2 oder 3 ist, die Sequenzen C₂ der aufeinanderfolgenden Gruppen (IRES-Y-C₂) untereinander gleich oder verschieden sein können und ferner C₁ und C₂ gleich oder verschieden sein können,

"IRES" eine Nukleotidsequenz viralen, zellulären oder synthetischen Ursprungs ist, die in der Stufe der Translation für die interne Initiation verantwortlich ist,

"Y" eine Nukleotidsequenz ist, welche im Zusammenwirken mit IRES für eine Expression des (der) in C₂ enthaltenen Gens(e) auf solche Weise sorgt, daß die Genprodukte von C₁ und C₂ in äquimolaren Mengen exprimiert werden,

72

"3'UTR" eine nicht translatierte Nukleotidsequenz ist

und

5 "polyA" ein Polyadenylierungssignal ist.

2. Expressionseinheit nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**,
daß IRES die 5'UTR des Poliovirus Typ 1, 2 oder 3, des
10 *Enzephalomyocarditis Virus* (EMV), des "*Theilers murine*
encephalomyelitis virus" (TMEV), des "*foot and mouth disea-*
se virus" (FMDV), des "*bovine enterovirus*" (BEV), des "*cox-*
sackie B virus" (CBV), des "*human rhinovirus*" (HRV) oder
die "*human immunoglobulin heavy chain binding protein*"
(BIP) 5'UTR, die *Drosophila Antennapediae* 5'UTR, die *Droso-*
15 *phila Ultrabithorax* 5'UTR oder genetische Hybride oder
Fragmente aus den oben angeführten Sequenzen ist.
3. Expressionseinheit nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekenn-**
zeichnet, daß IRES die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO: 5
20 ist.
4. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch**
gekennzeichnet, daß "Y" die β -Globinsequenz aus *Xenopus*
laevis, die *Alfalfa mosaic virus* RNA4 5' UTR, Ferritin
25 5' UTR (animal), *Tobacco mosaic virus* 5' UTR (Omega) oder
deren Leadermutanten, *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV)
5' UTR, *Brome mosaic virus* (BMV) RNA3 5' UTR, *Rous sarcoma*
virus (RSV) 5' UTR, *Adenovirus tripartite leader* (L1-3) und
Varianten derselben, *Xenopus borealis* 5' UTR β -Globin oder
30 *Xenopus tropicalis* 5' UTR β -Globin Sequenz ist.
5. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 4, **dadurch**
gekennzeichnet, daß "Y" die β -Globinsequenz aus *Xenopus*
laevis gemäß SEQ ID NO: 6, ein Fragment oder eine Variante
35 derselben ist.

73

6. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß IRES die *Poliovirus* Typ 1 UTR gemäß SEQ ID NO: 5 und "Y" die β -Globinsequenz aus *Xenopus laevis* gemäß SEQ ID NO: 6 sind.
- 5
7. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß C₁ und C₂ jeweils Gene enthalten, die für Polypeptid-Untereinheiten singulärer oder heteromerer Proteine kodieren.
- 10
8. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß C₁ und C₂ jeweils Gene enthalten, welche für die verschiedenen Untereinheiten von Faktor VIII, Kreatin-Kinase, Hämoglobin, Immunglobulinen, Histokompatibilitäts-Antigenen, Scatter-Faktor (HGF-SF), Mitgliedern der Familie des Transforming Growth Factor Typ β , des Bone Morphogenic Proteins (BMP) Mitgliedern der Integrin-Familie, PDGF oder deren natürliche oder synthetische Varianten und Derivate enthalten.
- 15
9. Expressionseinheit nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß "n" 1 ist und C₁ und C₂ alternativ ein für die A- oder die B-Kette von PDGF, ein biologisch aktives Analogon oder ein Fragment derselben kodierendes Gen enthalten, wobei beide Gene gleichzeitig in der Expressionseinheit vertreten sind.
- 20
10. Expressionseinheit nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß C₁ oder C₂ die PDGF-A_x- (SEQ ID Nr. 1) oder die PDGF-A_L Vorläufer-Sequenz enthält.
- 25
- 30
11. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 9 oder 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß C₁ oder C₂ die vollständige PDGF-B Vorläufersequenz (SEQ ID Nr. 3), das v-sis-Gen aus Simian Sarcoma Virus oder Varianten dieser Sequenzen.
- 35

74

12. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 9 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß C₁ oder C₂ ein Genfragment enthalten, das für ein PDGF-B-Vorläufermolekül kodiert, welches durch Ersetzen des für Arginin kodierenden Kodons in der Aminosäureposition 191 durch ein Translations-Stop-Kodon verkürzt ist (SEQ ID Nr. 24).
13. Expressionseinheit nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß C₁ und C₂ alternativ die PDGF-A_x-Sequenz (SEQ ID Nr. 1) oder die verkürzte PDGF-B190 Vorläufersequenz (SEQ ID Nr. 24) enthalten und beide Gene gleichzeitig in der Expressionseinheit vertreten sind.
14. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß "n" 1 ist und C₁ und C₂ voneinander verschiedene Reportergene enthalten.
15. Expressionseinheit nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Reportergene für Luciferase bzw. für sekretorische alkalische Phosphatase kodieren.
16. Rekombinanter DNA-Vektor, welcher eine Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 15, operativ insertiert enthält.
17. Wirtszelle, welche eine Säugerzelle transformiert mit einem Vektor gemäß Anspruch 16 ist.
18. Wirtszelle nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine CHO- oder BHK-Zelle ist.
19. Wirtszelle **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine Säugerzelle ist, die mit einem Vektor transformiert ist, welcher die Expressionseinheit nach den Ansprüchen 9 bis 13 operativ insertiert enthält.

75

20. Wirtszelle nach Anspruch 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine CHO- oder BHK-Zelle ist.
21. Wirtszelle nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine PDGF-AB produzierende BHK-Zelle ist, die von einem der Klone 92-22-6 entsprechend DSM ACC 2048 oder 92-22-7 entsprechend DSM ACC 2049 abstammt.
22. Verfahren zur Herstellung von Proteinen bestehend aus äquimolaren Anteilen von Polypeptiduntereinheiten, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Wirtszellen nach den Ansprüchen 17 bis 21 in einem geeigneten Medium kultiviert und das so erzeugte Protein von den Zellen und dem Medium abtrennt.
23. Verfahren nach Anspruch 22 zur Herstellung von heteromeren Proteinen.
24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Protein Faktor VIII, Kreatin-Kinase, Hämoglobin, ein Immunglobulin, ein Histokompatibilitäts-Antigen, Scatter-Faktor (HGF-SF), ein Mitglied der Transforming Growth Factor Typ β -Familie, Bone-Morphogenic Protein (BMP), ein Mitglied der Integrin-Familie, PDGF oder eine natürliche oder synthetische Variante oder ein Derivat derselben ist.
25. Verfahren zur Herstellung von heteromerem rPDGF-AB, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Wirtszellen nach den Ansprüchen 19 bis 21 in einem geeigneten Medium kultiviert und das so erzeugte rPDGF-AB von den Zellen und dem Medium abtrennt.
26. Heterodimeres rPDGF-AB, im wesentlichen frei von homodimeren Begleitprodukten, **erhältlich durch** Kultivieren von Säugerzellen als Wirtszellen, die eine Expressionseinheit nach den Ansprüchen 9 bis 13 operativ verknüpft enthalten, in einem geeigneten Medium und Abtrennen des so erzeugten rPDGF-AB von den Zellen und dem Medium.

76

27. Heterodimeres rPDGF-AB nach Anspruch 26, **erhältlich durch** Kultivieren von BHK- oder CHO-Zellen als Wirtszellen.
28. Heterodimeres, im wesentlichen von homodimeren Begleitprodukten freies rPDGF-AB, **erhältlich durch** Kultivieren von Wirtszellen nach den Ansprüchen 19 bis 21, in einem geeigneten Medium und Abtrennen des so erzeugten rPDGF-AB von den Zellen und dem Medium.
29. Pharmazeutisches und/oder kosmetisches Präparat, enthaltend rPDGF-AB nach den Ansprüchen 26 bis 28 zusammen mit pharmazeutisch und/oder kosmetisch verträglichen Hilfs- und Trägerstoffen.
30. Pharmazeutisches Präparat, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Salbe, ein Spray, Gel, Wundverband, ein Pflaster oder eine Wundauflage ist.
31. Wirtszelle **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine Säugerzelle ist, die mit einem Vektor transformiert ist, welcher die Expressionseinheit nach den Ansprüchen 14 oder 15 operativ insertiert enthält.
32. Wirtszelle nach Anspruch 31, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie von einem der Klone 91-46-9 entsprechend DSM ACC 2046 oder 91-46-10 entsprechend DSM ACC 2047 abstammt.
33. Verfahren zum Auffinden von translations-beeinflussenden Sequenzen "Y", welche im Zusammenwirken mit IRES in Expressionseinheiten nach den Ansprüchen 1 bis 15 die äquimolare Expression der Genprodukte von C₁ und C₂ bewirken, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
- (a) die zu untersuchenden Sequenzen als Y in Expressionseinheiten nach den Ansprüchen 1, 14 oder 15 einbringt,

77

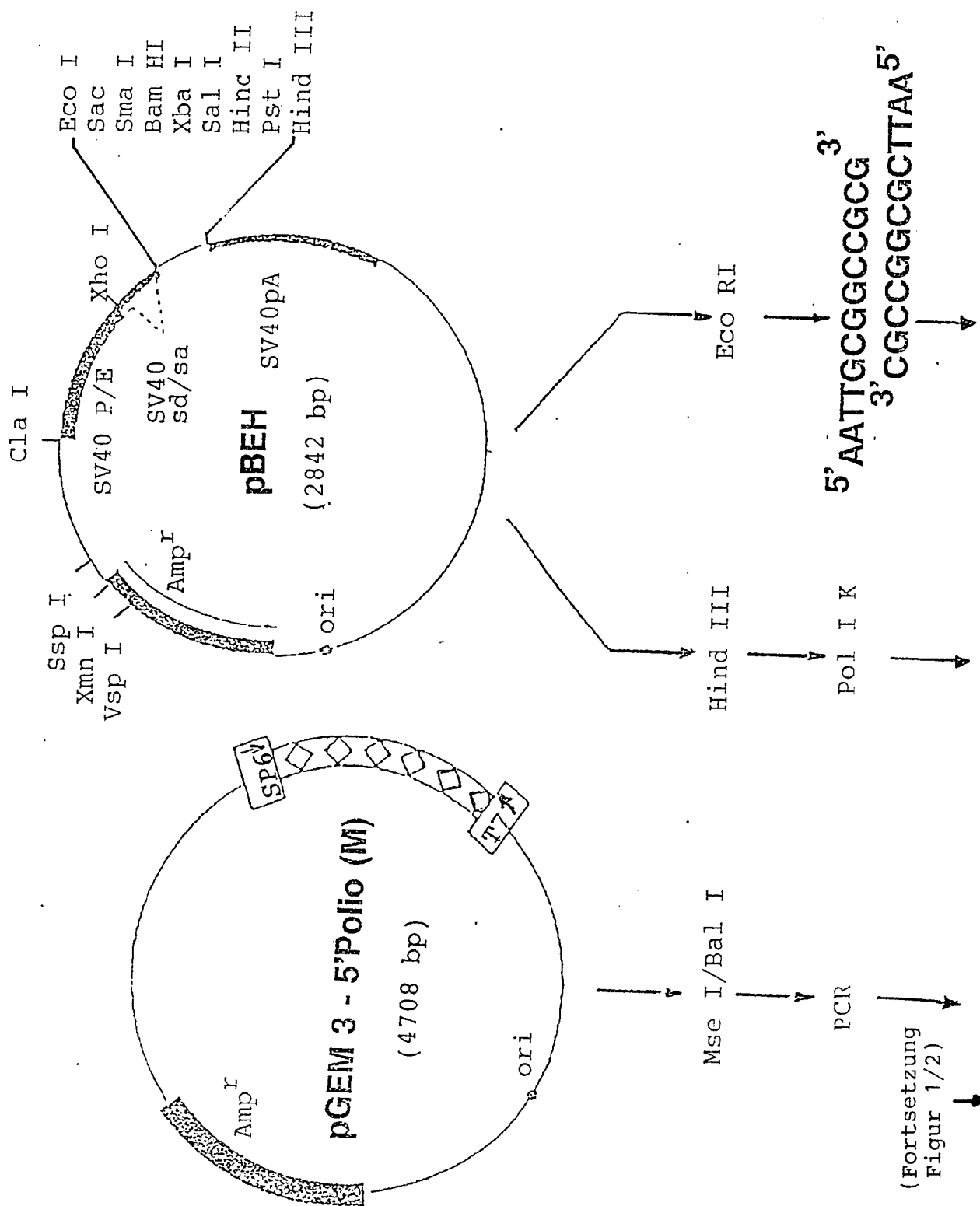
- (b) Vektoren konstruiert, welche die jeweilige Expressionseinheit operativ insertiert enthalten,
- (c) Säugerzellen als Wirtszellen mit den Vektoren aus Stufe (b) transformiert und in einem geeigneten Medium kultiviert, und
- (d) die Expressionsprodukte von C_1 und C_2 in dem Medium oder nach Abtrennen von den Zellen und/oder dem Medium quantifiziert.
34. Verfahren nach Anspruch 33, **dadurch gekennzeichnet**, daß in Stufe (c) CHO- oder BHK-Zellen als Wirtszellen verwendet werden.
35. Verfahren nach Anspruch 33, **dadurch gekennzeichnet**, daß in Stufe (c) Wirtszellen gemäß Anspruch 30 verwendet werden.
36. Verfahren nach den Ansprüchen 33 bis 35, **dadurch gekennzeichnet**, daß IRES eine Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 5 ist.
37. Verfahren zum Auffinden von translations-initiierenden Sequenzen IRES, welche im Zusammenwirken mit "Y" in Expressionseinheiten nach den Ansprüchen 1 bis 15 die äquimolare Expression der Genprodukte von C_1 und C_2 bewirken, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
- (a) die zu untersuchenden Sequenzen als IRES in Expressionseinheiten nach den Ansprüchen 1, 14 oder 15 einbringt,
- (b) Vektoren konstruiert, welche die jeweilige Expressionseinheit operativ insertiert enthalten,

78

- (c) Säugerzellen als Wirtszellen mit den Vektoren aus Stufe (b) transformiert und in einem geeigneten Medium kultiviert, und
- 5 (d) die Expressionsprodukte von C_1 und C_2 in dem Medium oder nach Abtrennen von den Zellen und/oder dem Medium quantifiziert.
38. Verfahren nach Anspruch 37, **dadurch gekennzeichnet**, daß in
10 Stufe (c) CHO- oder BHK-Zellen als Wirtszellen verwendet werden.
39. Verfahren nach Anspruch 37, **dadurch gekennzeichnet**, daß in
15 Stufe (c) Wirtszellen gemäß Anspruch 31 verwendet werden.
40. Verfahren nach den Ansprüchen 37 bis 39, **dadurch gekennzeichnet**, daß "Y" eine Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 6 ist.

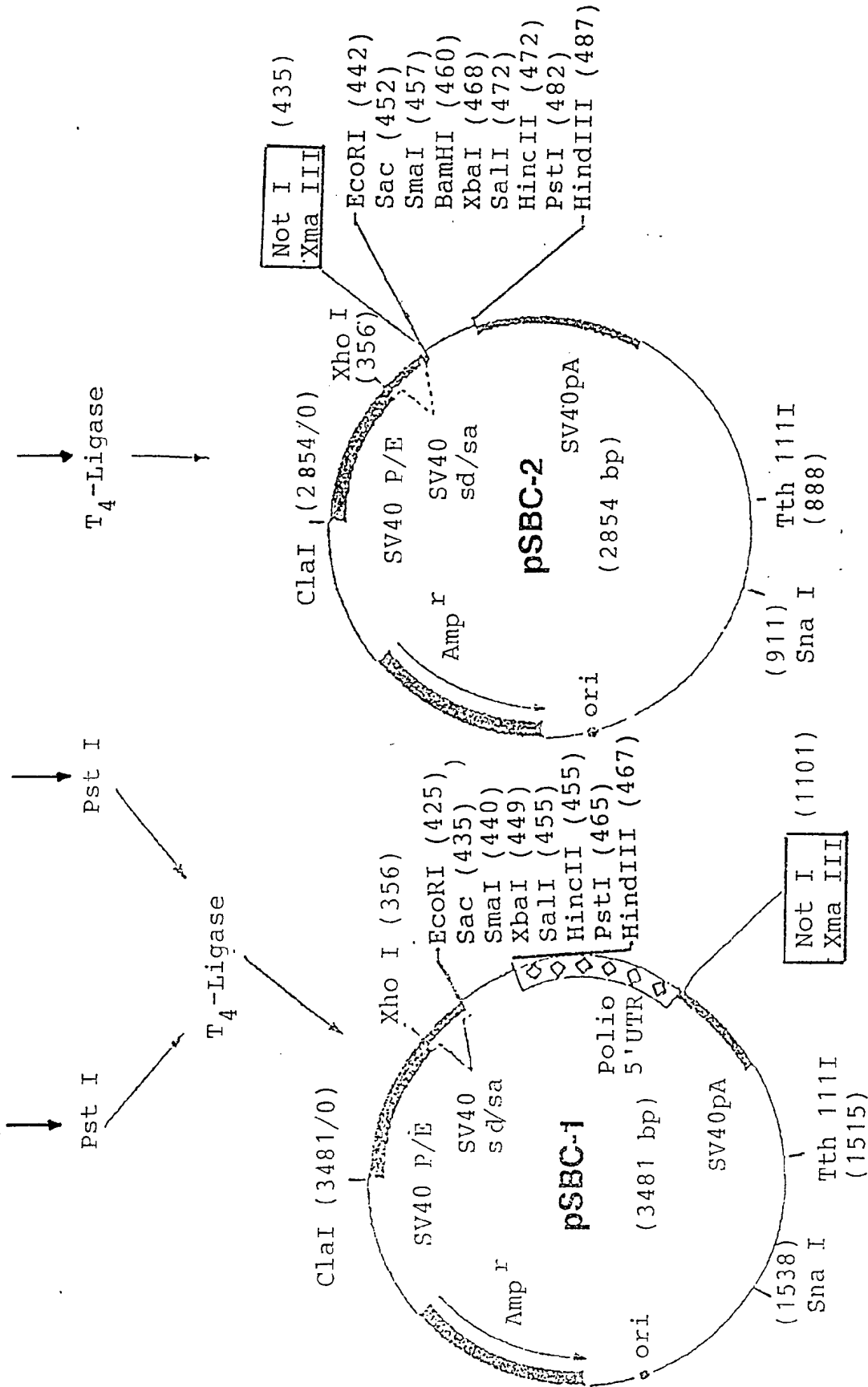
Figur 1/1

1/23



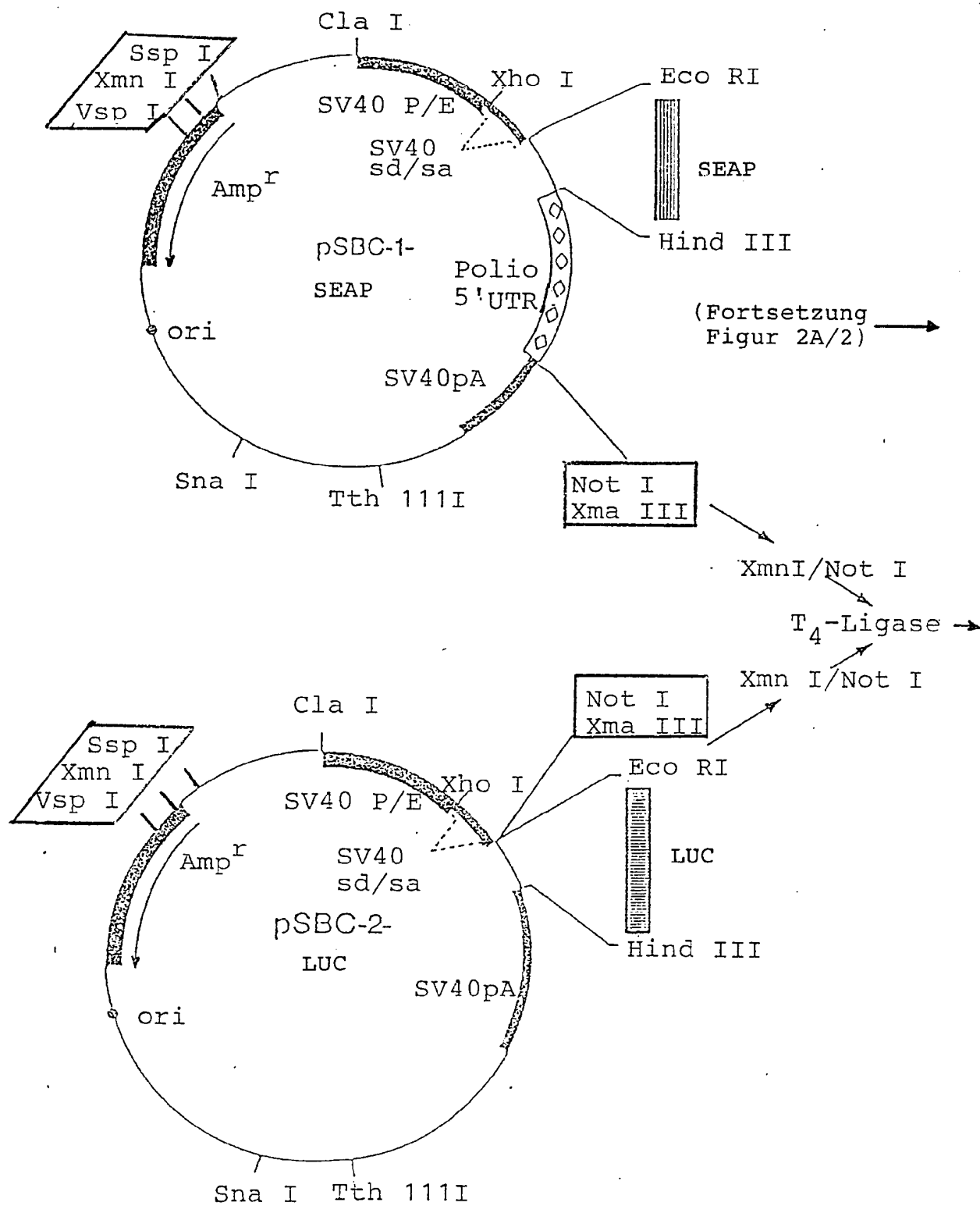
Figur 1/2

2/23



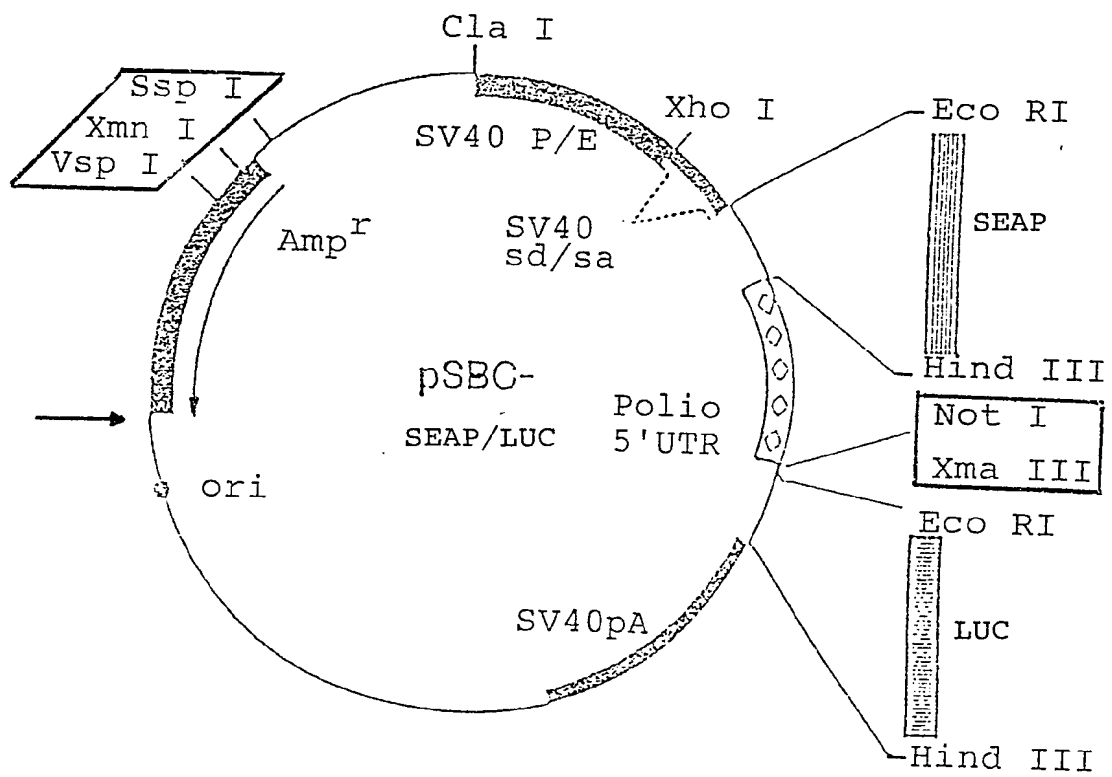
Figur 2A/1

3/23



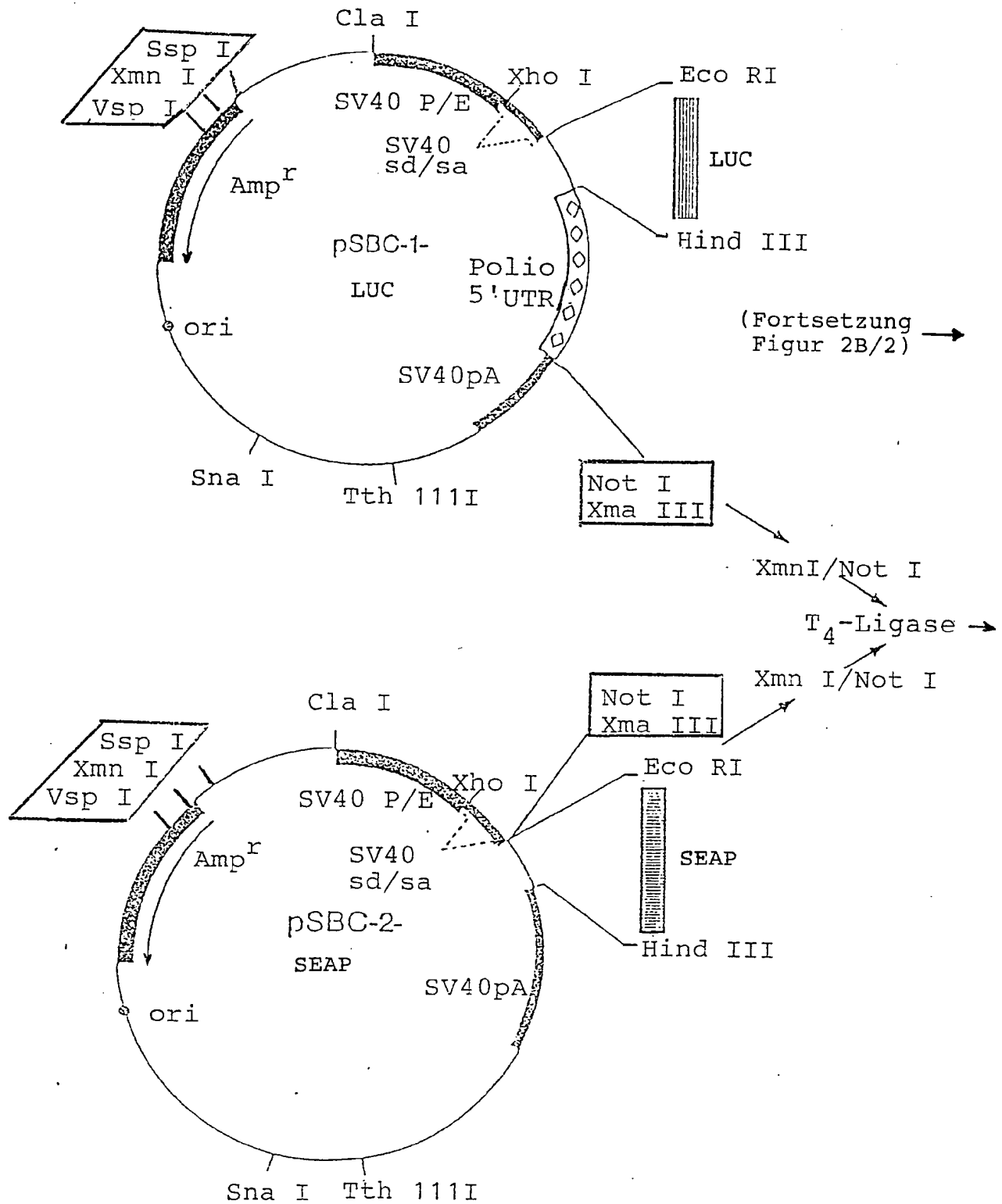
4/23

Figur 2A/2



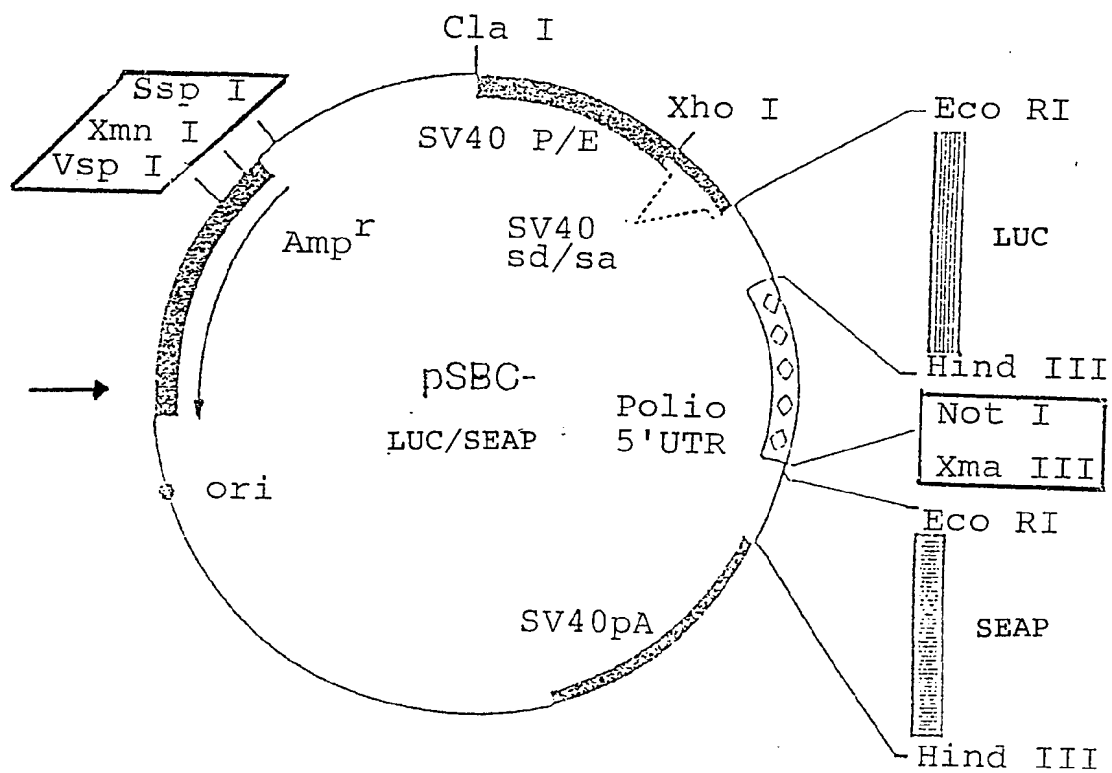
Figur 2B/1

5/23



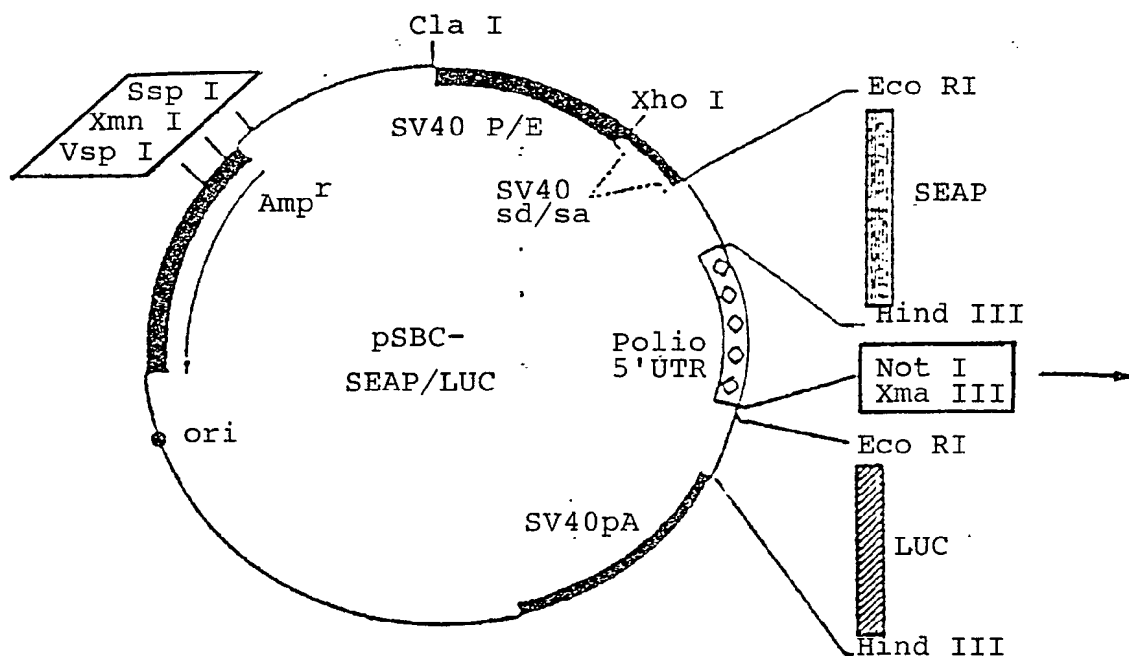
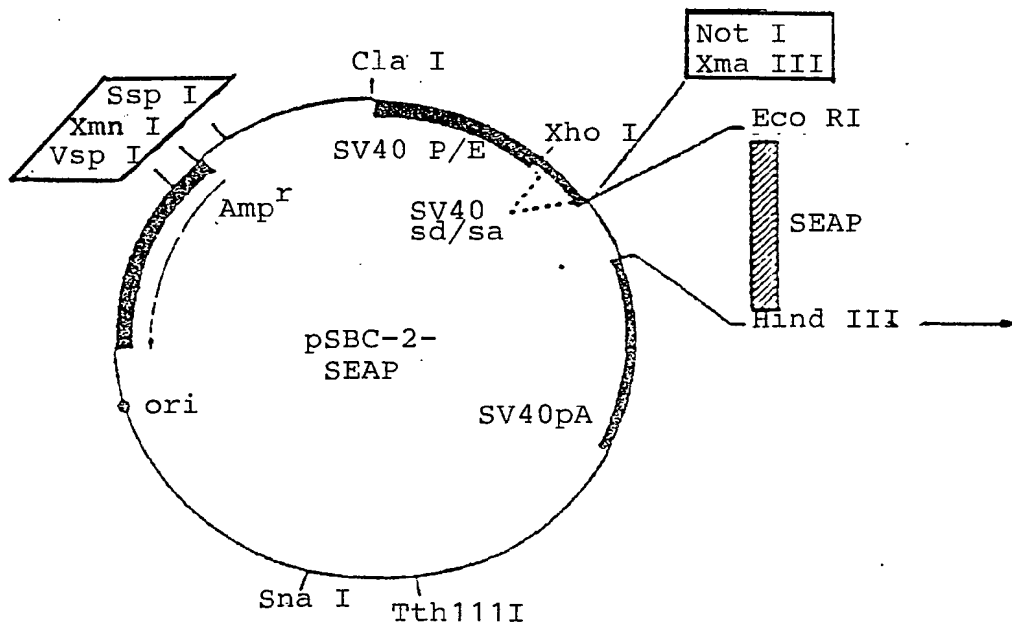
Figur 2B/2

6/23



Figur 2C/1

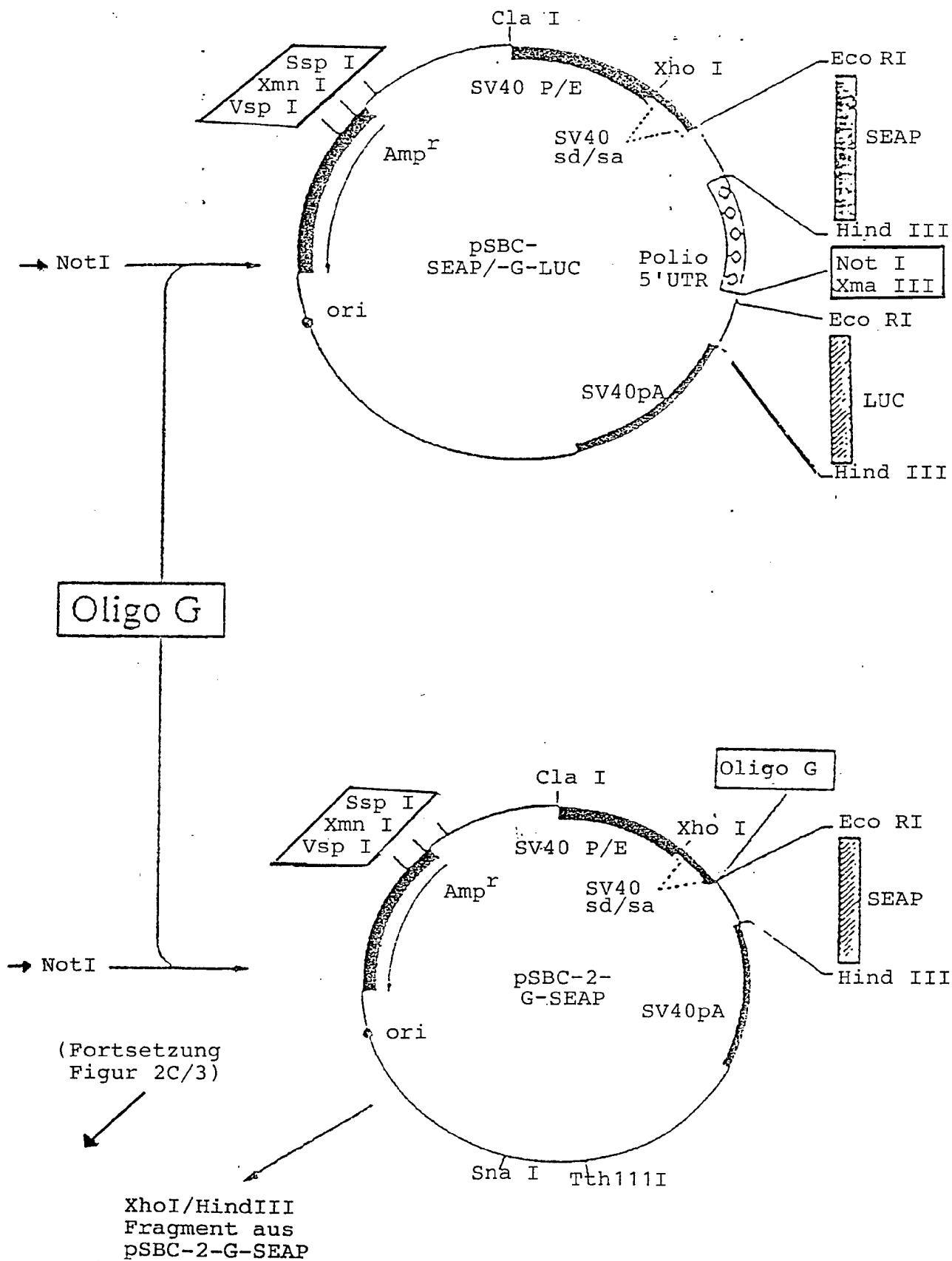
7/23

(Fortsetzung
Figur 2C/2) →

ERSATZBLATT

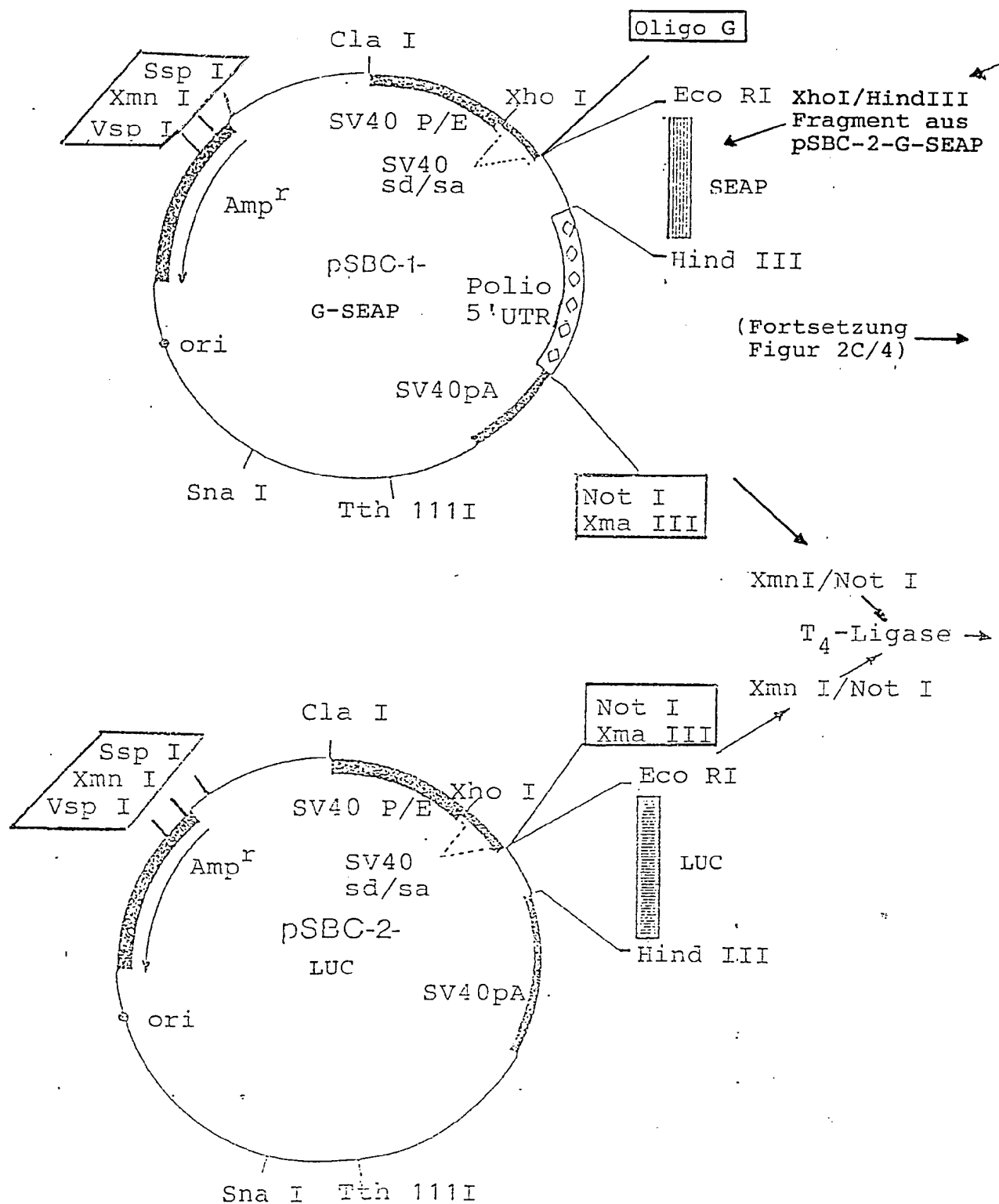
Figur 2C/2

8/23



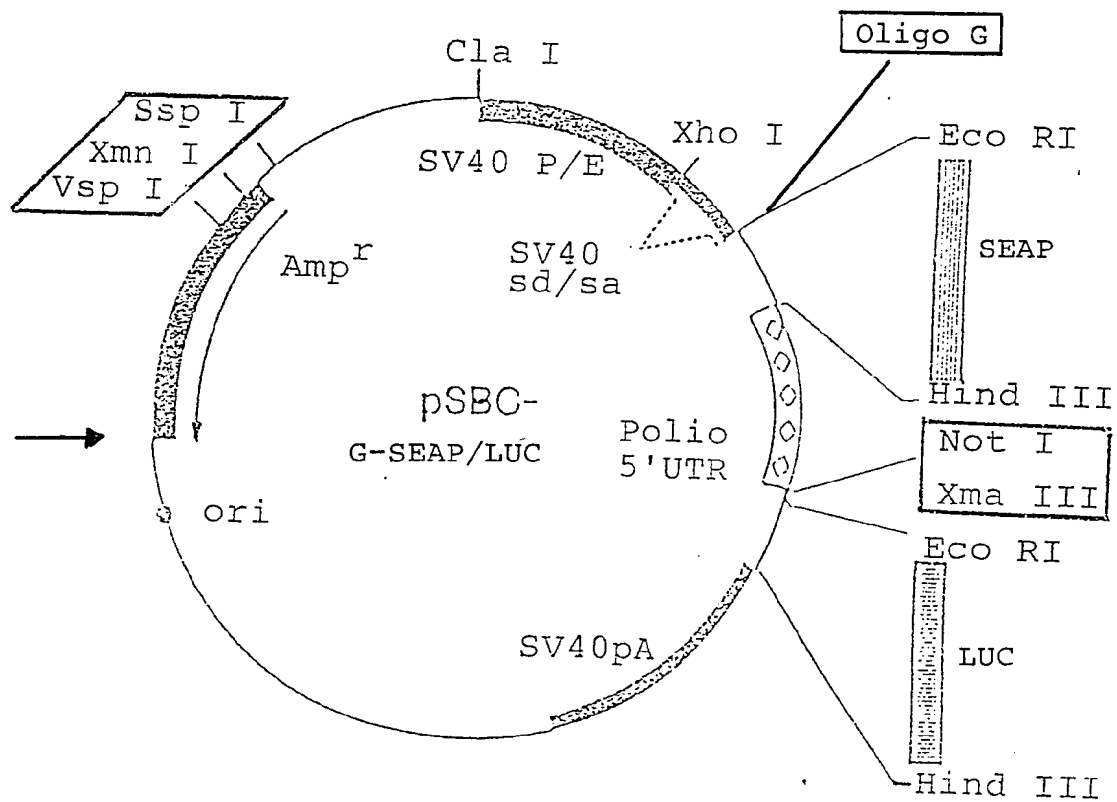
Figur 2C/3

9/23



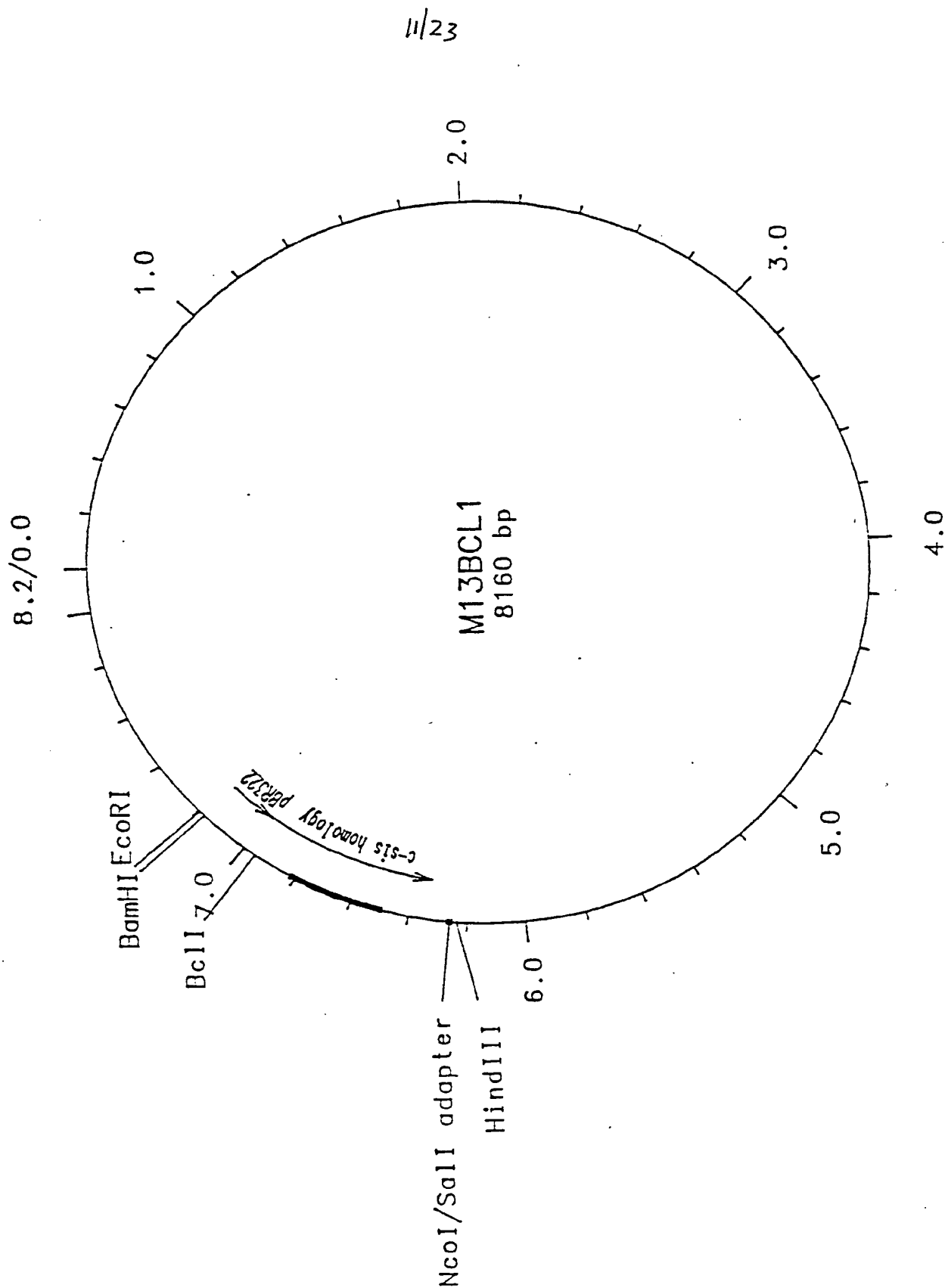
Figur 2C/4

10/23



ERSATZBLATT

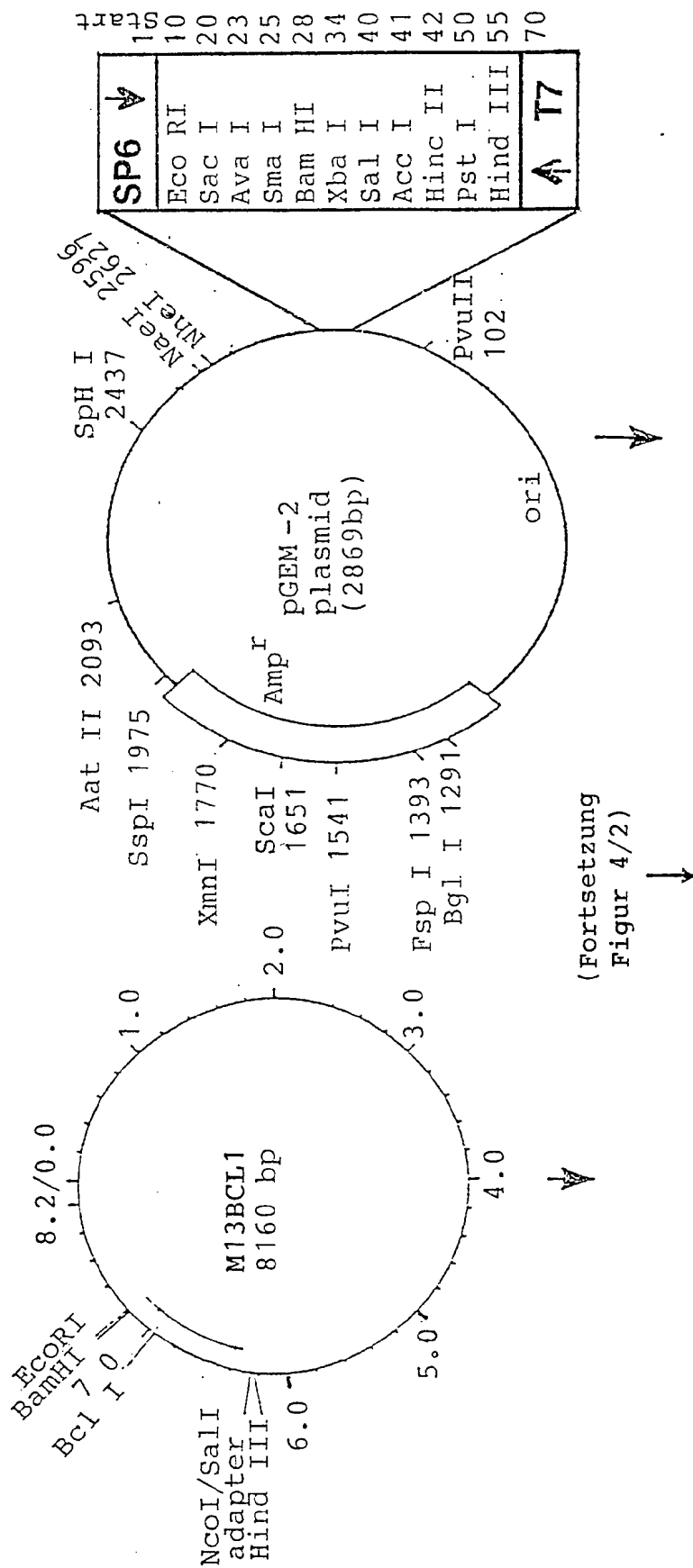
Figur 3



ERSATZBLATT

Figur 4/1

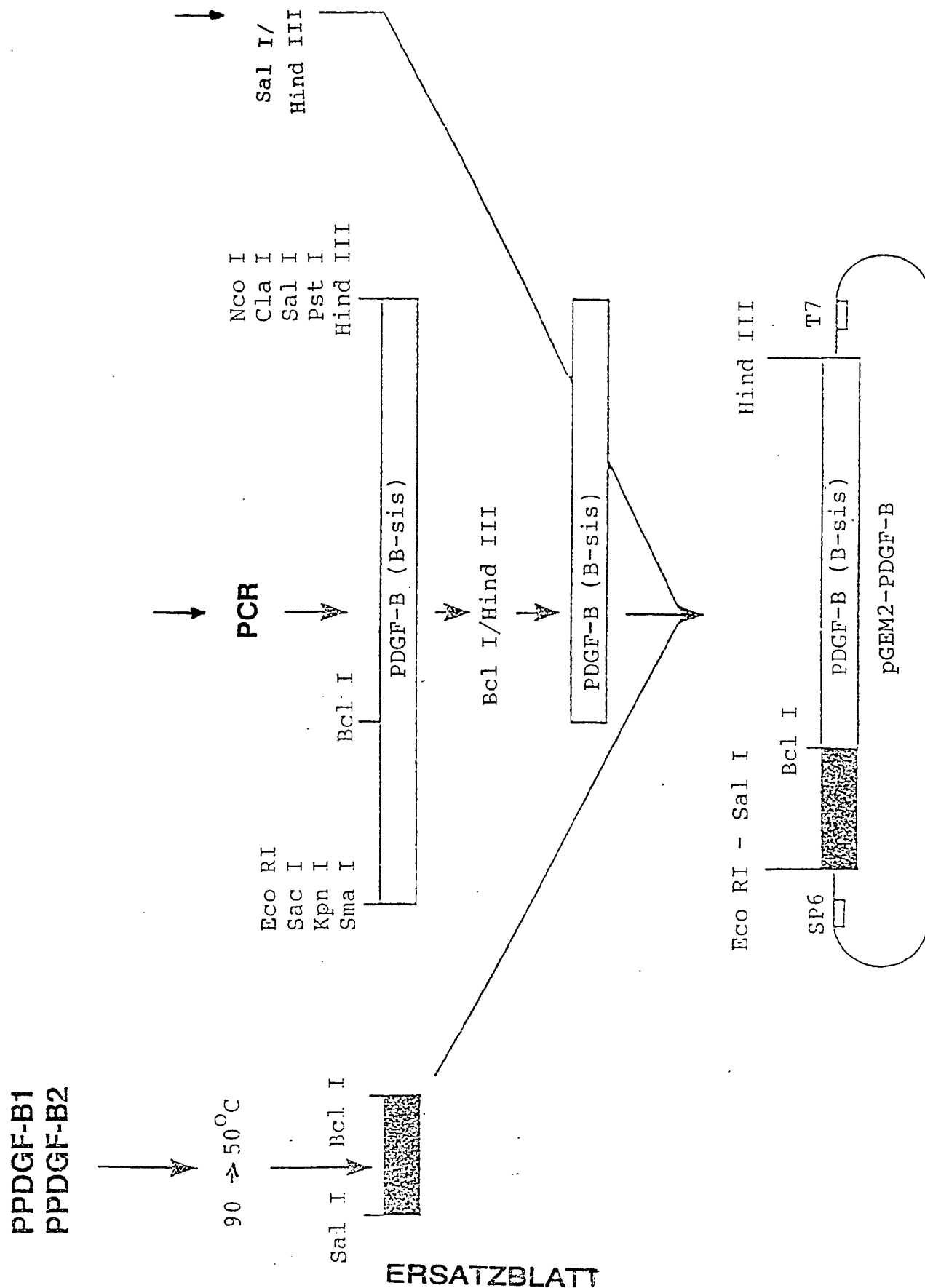
12/23



(Fortsetzung
Figur 4/2)

Figur 4/2

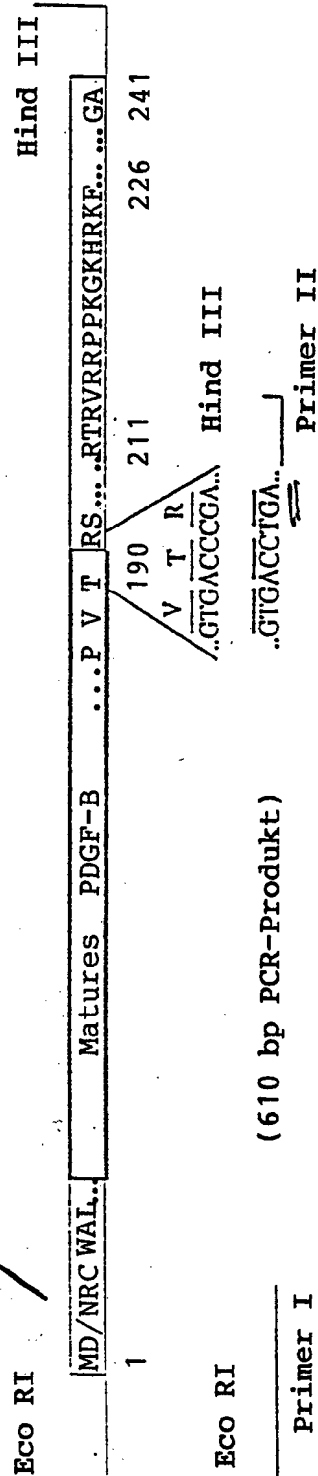
13/23



Figur 5

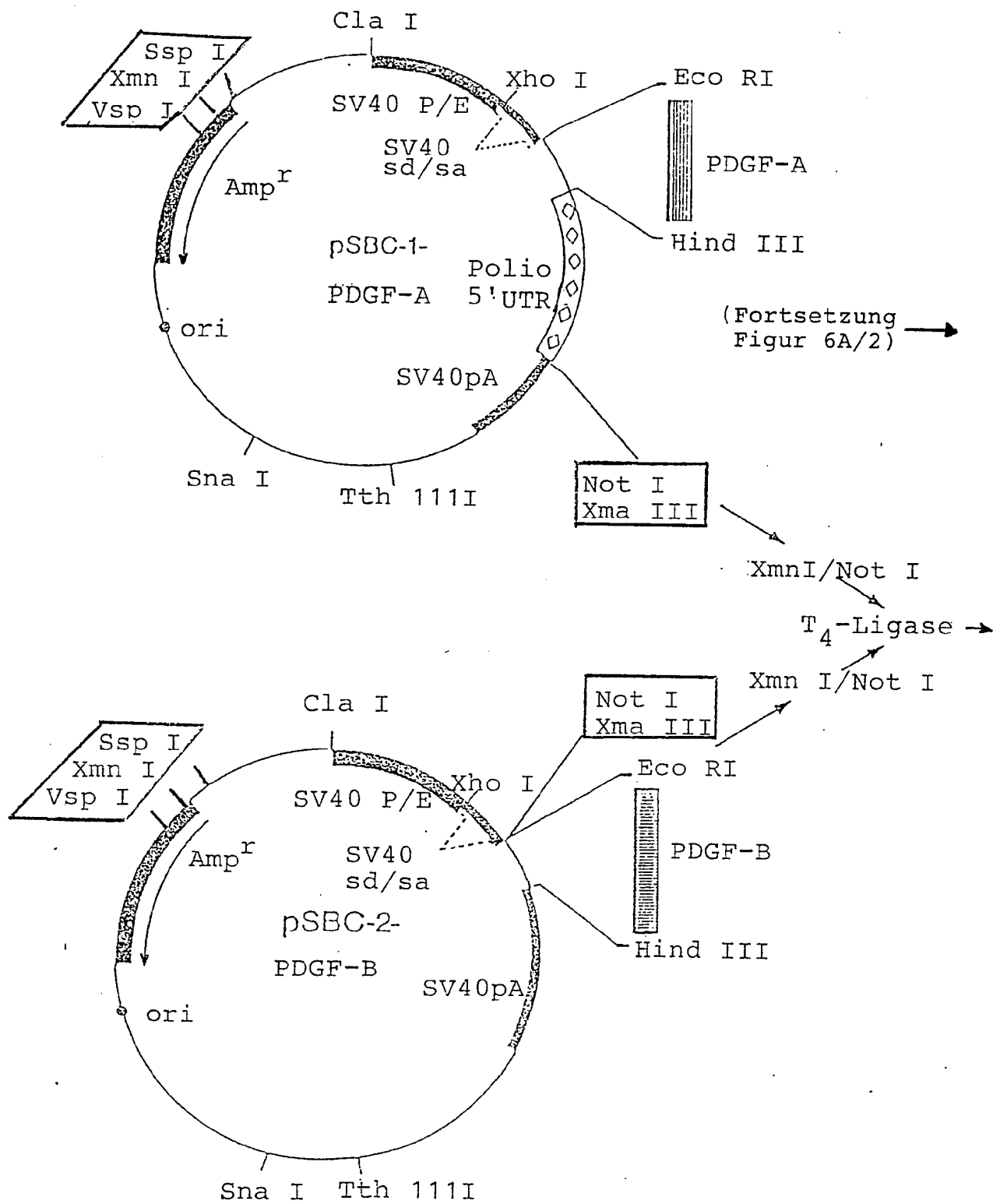
14/23

Mutagenese von PDGF-B



Figur 6A/1

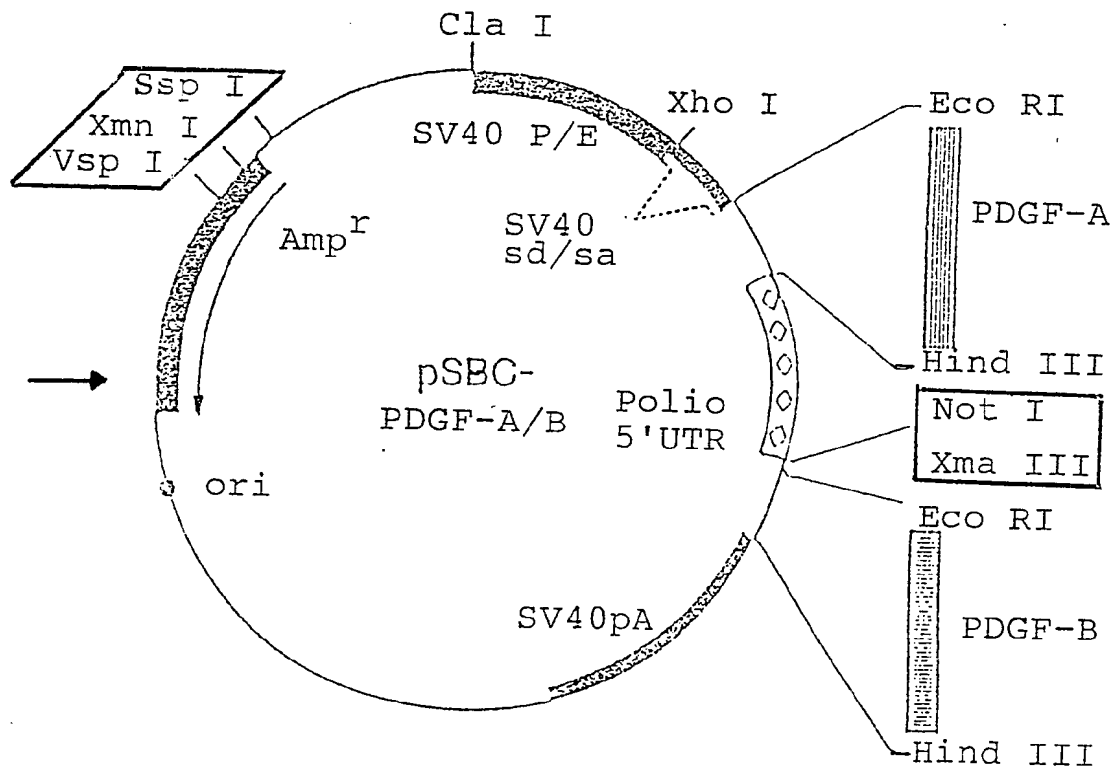
15/23



ERSATZBLATT

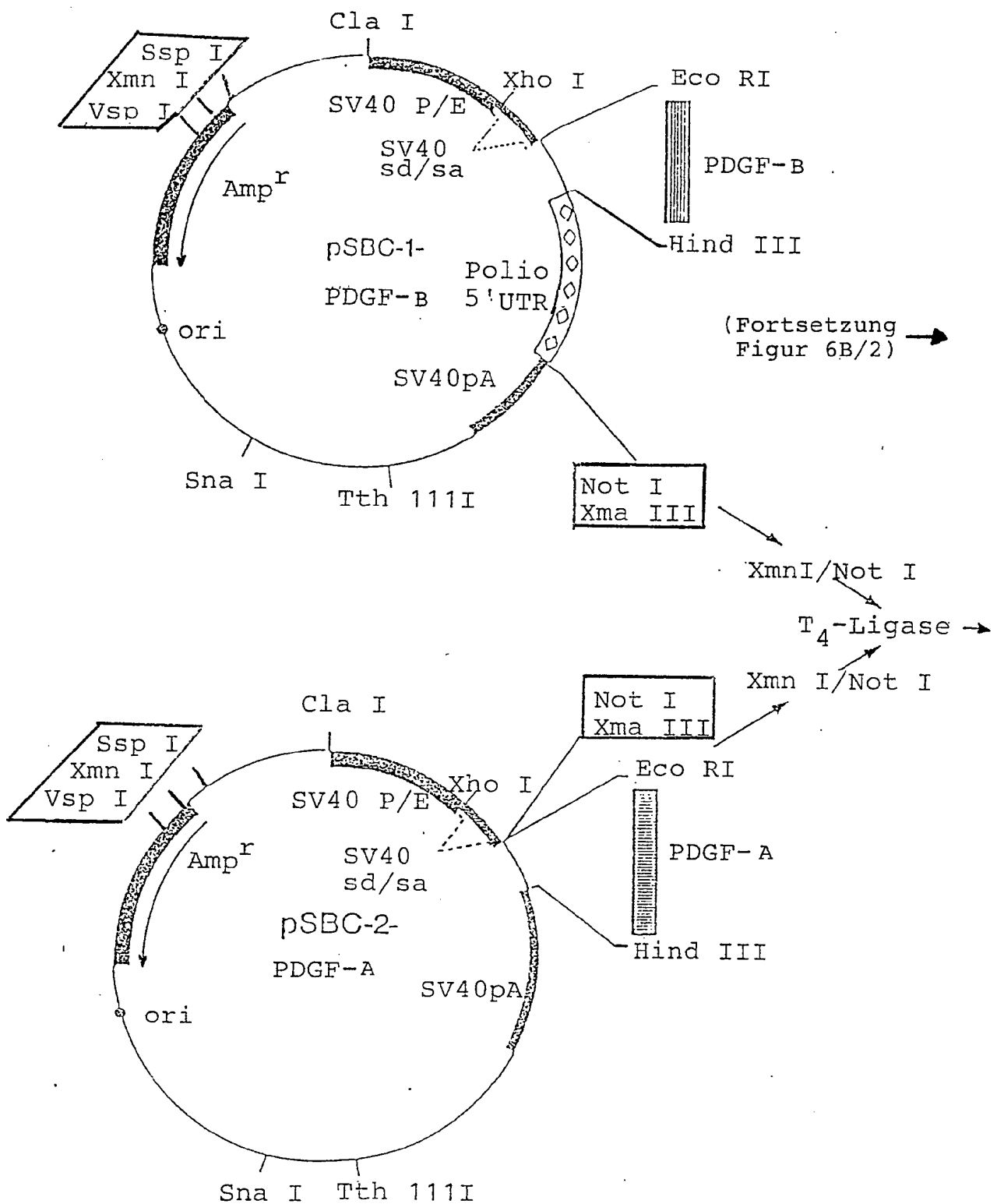
Figur 6A/2

16/23



Figur 6B/1

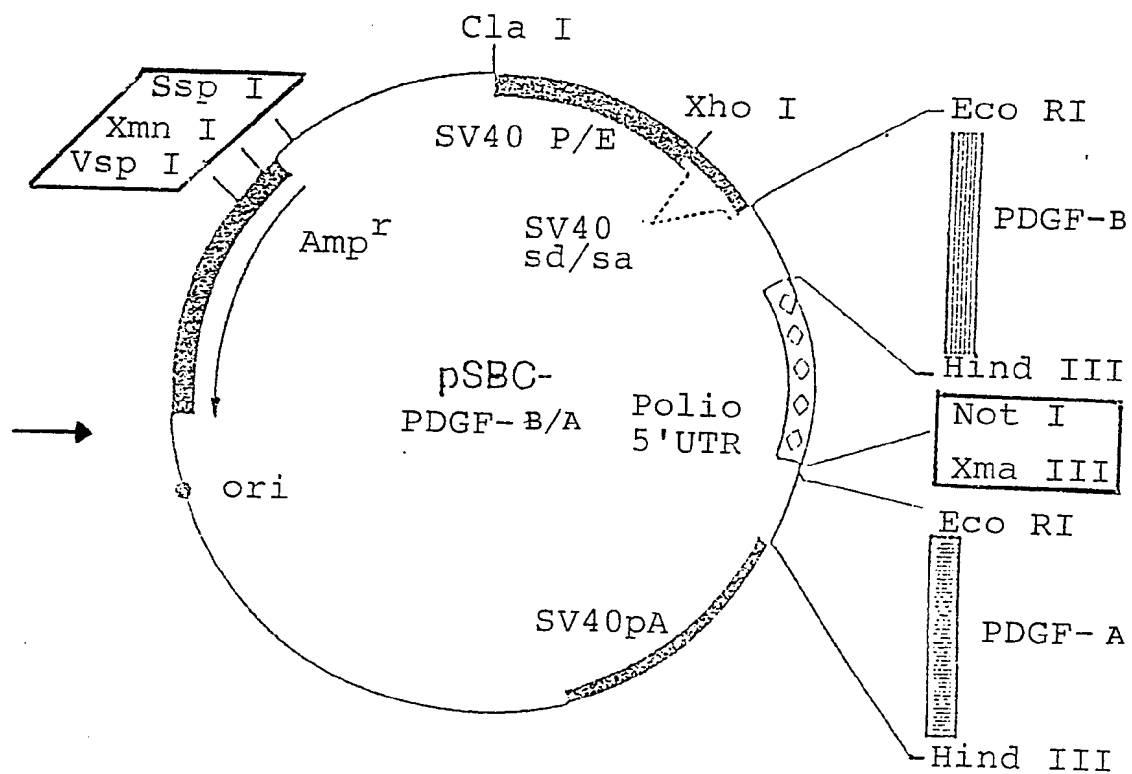
17/23



ERSATZBLATT

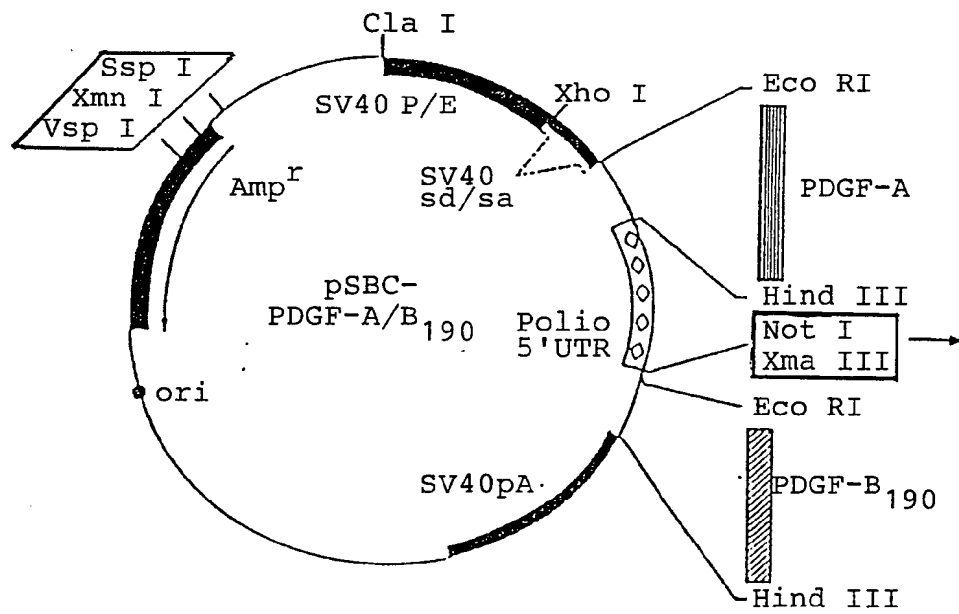
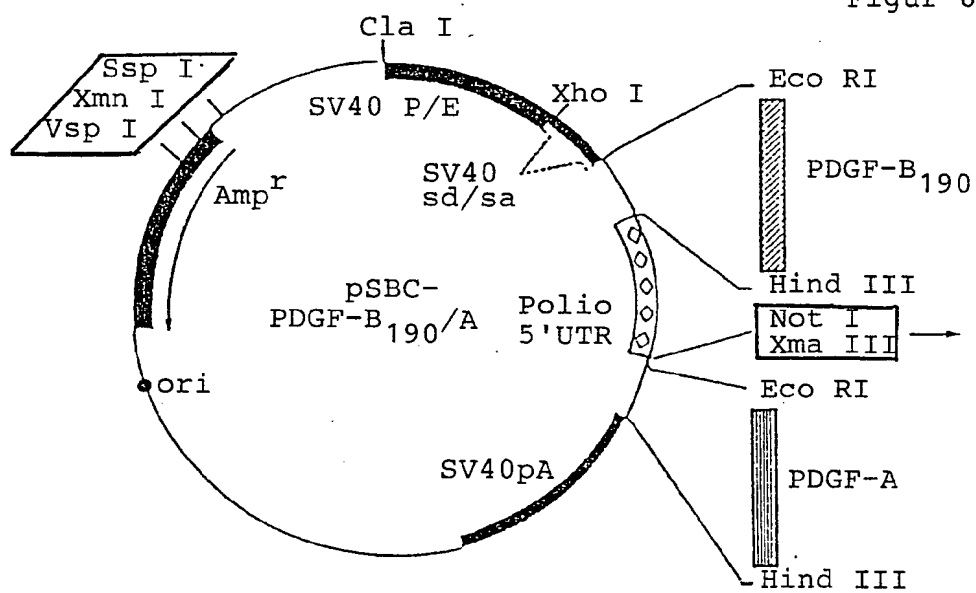
Figur 6B/2

18/23



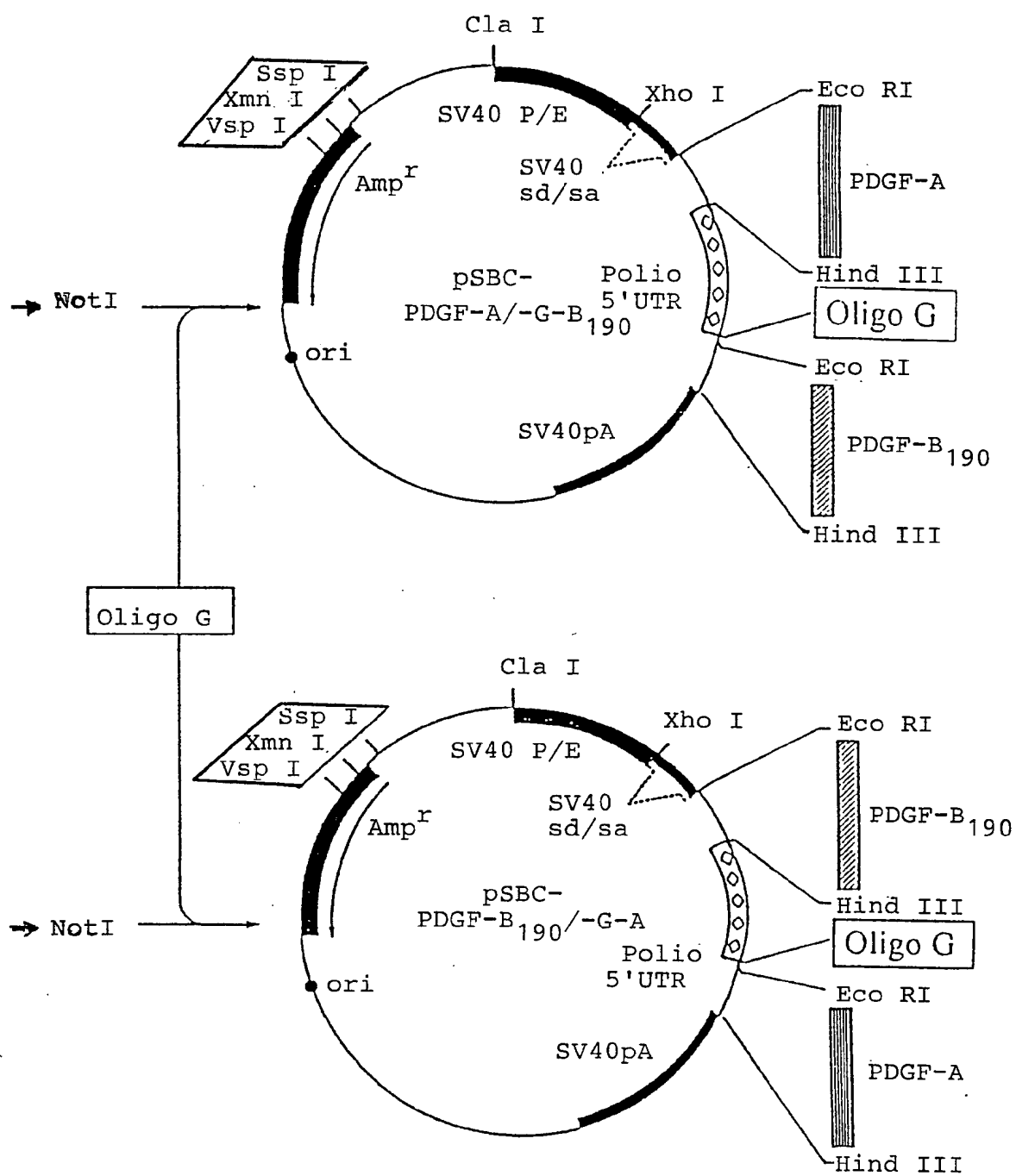
Figur 6C/1

19/23

(Fortsetzung
Figur 6C/2) →

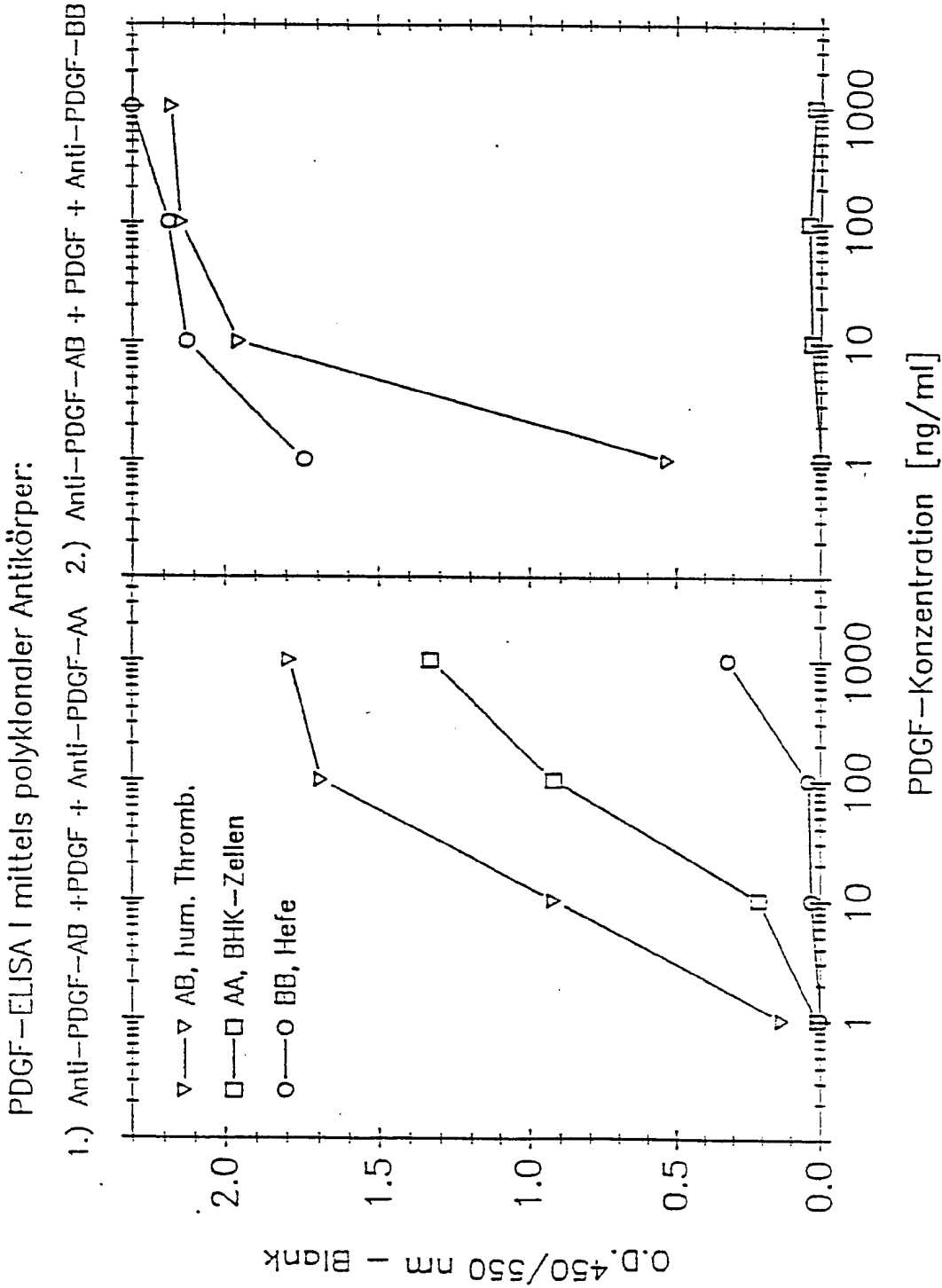
Figur 6C/2

20/23



Figur 7

21/23

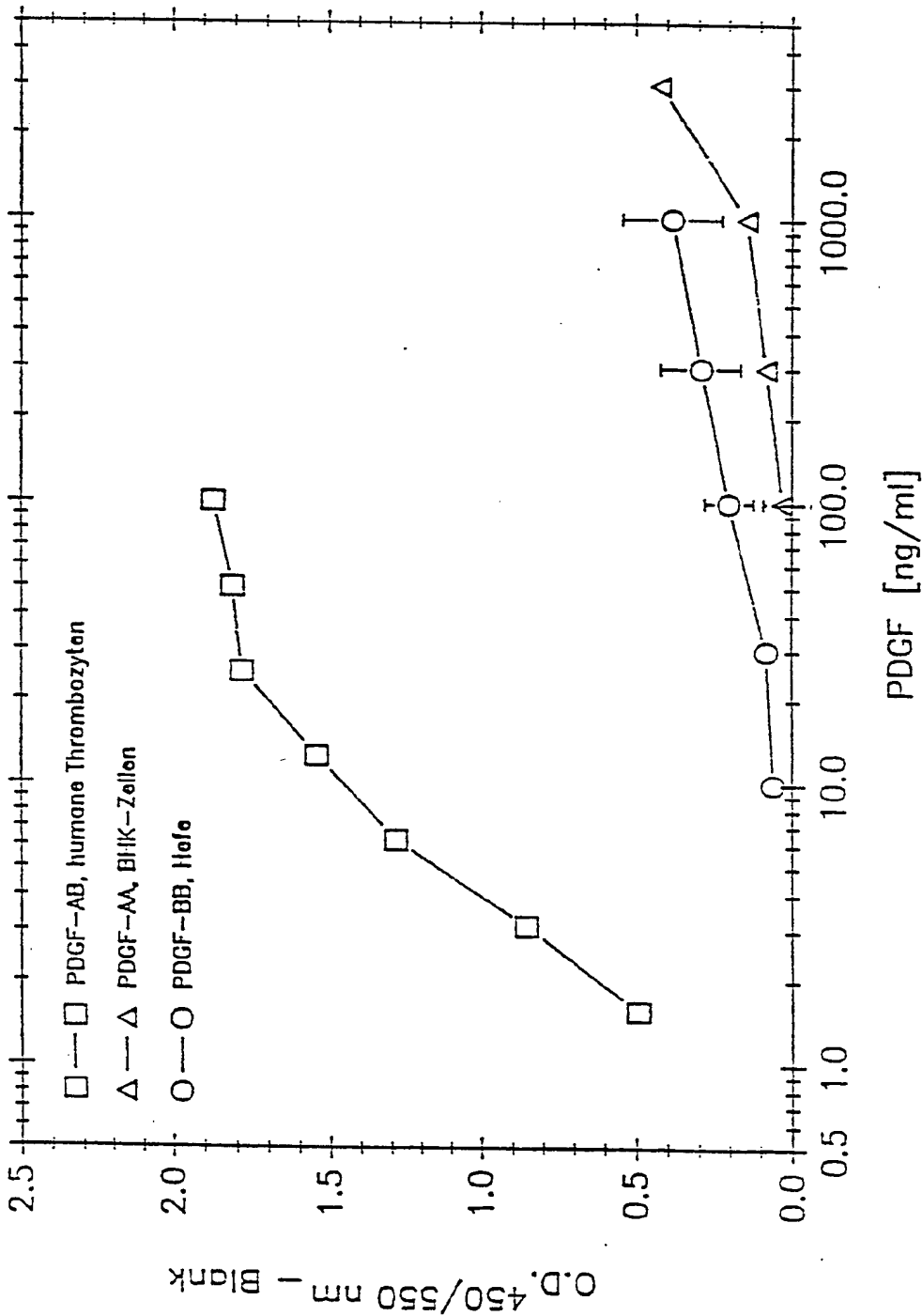


Figur 8

22/23

PDGF-AB-ELISA (B-spez. monokl. Antikörper + polykl. Anti-PDGF-AA):

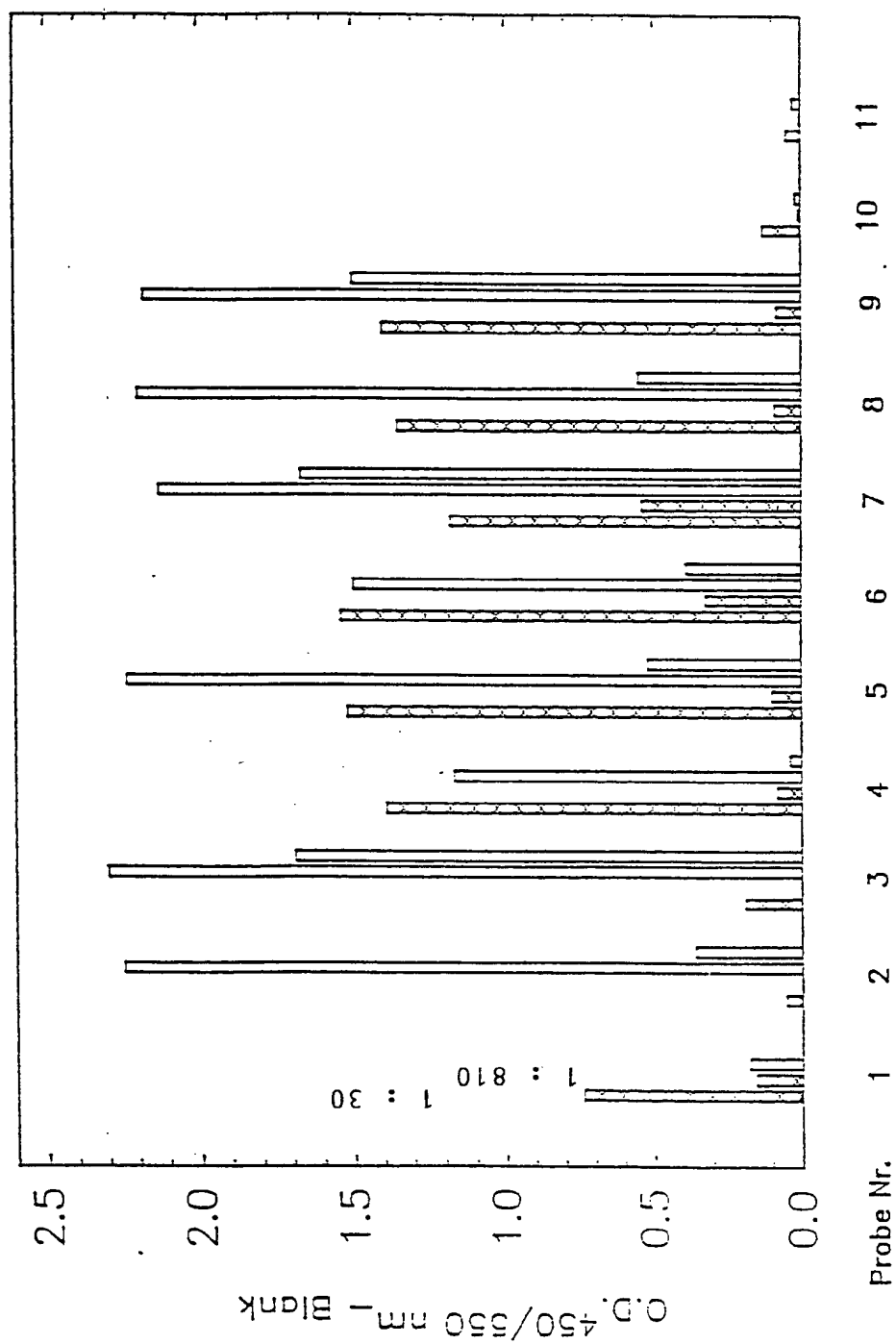
Eichkurven von PDGF-Standards



Figur 9

23/23

Kulturbedingungen von rekomb. BHK-Zellen (1:30 bzw 1:810 verd.) im ELISA I
mittels polykl. Antikörper: \boxtimes Anti-PDGF-A und \square Anti-PDGF-BB



ERSATZBLATT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. Application No

PCT/EP 93/02294

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 C12N15/12 C12N15/63 C12N15/67 C12N15/85 C07K13/00
A61K37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 259 632 (ZYMOGENETICS, INC.) 16 March 1988 cited in the application see page 12, line 29 - line 35; claims 1-36; figures 1-8 ---	26-30
X	J. BIOL. CHEM. vol. 263, no. 31, 5 November 1988, AM. SOC. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US; pages 16202 - 16208 A. OSTMAN ET AL. 'Synthesis and assembly of a functionally active recombinant platelet-derived growth factor AB heterodimer' cited in the application see page 16205, right column, line 12 - page 16207, right column, line 17; figure 1 --- -/--	26-28

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 November 1993

Date of mailing of the international search report

93-01-1994

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nal Application No

PCT/EP 93/02294

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BIOCHEMISTRY vol. 29, no. 1 , 9 January 1990 , AM. CHEM. SOC., WASHINGTON, DC, US; pages 166 - 172 C.E. HART ET AL. 'Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets' cited in the application see page 168, right column, line 20 - page 169, left column, line 22 see page 169, left column, line 23 - right column, line 8; figure 1 ---</p>	26-28
Y	<p>WO,A,90 01550 (ZYMOGENETICS, INC.) 22 February 1990 cited in the application see page 7, line 15 - page 8, line 10; claims 1-15 ---</p>	1-6
Y	<p>MOL. CELL. BIOL. vol. 11, no. 5 , May 1991 , AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, D.C. US; pages 2656 - 2664 D. FALCONE AND D.W. ANDREWS 'Both the 5' untranslated region and the sequences surrounding the start site contribute to efficient initiation of translation in vitro' cited in the application see page 2662, left column, paragraph 2 - page 2663, left column, paragraph 3; figure 2 ---</p>	1-6
A	<p>WO,A,90 08163 (HOPPE, J.) 26 July 1990 cited in the application see page 13, line 1 - page 14, line 11; claims 1-14 ---</p>	26-30
A	<p>J. BIOL. CHEM. vol. 263, no. 31 , 5 November 1988 , AM. SOC. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US; pages 16493 - 16498 A. HAMMACHER ET AL. 'A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain' cited in the application insgesamt ---</p>	26-30
	<p>---</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.

PCT/EP 93/02294

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCE vol. 15, no. 12 , December 1990 , ELSEVIER SCIENCE, AMSTERDAM, NL; pages 477 - 483 R.J. JACKSON ET AL. 'The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation' cited in the application insgesamt ---</p>	1-3
A	<p>NUCL. ACID RES. vol. 19, no. 16 , 25 August 1991 , IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; pages 4485 - 4490 R.J. KAUFMAN ET AL. 'Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus' cited in the application insgesamt ---</p>	1-3
P,Y	<p>WO,A,93 03143 (ANDERSON, W., MORGAN, R.A., COUTURE, L.) 18 February 1993 see page 5, line 16 - page 9, line 17 -----</p>	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Application No

PCT/EP 93/02294

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0259632	16-03-88	US-A- 4766073	23-08-88
		US-A- 4849407	18-07-89
		US-A- 4845075	04-07-89
		US-A- 4889919	26-12-89
		AU-A- 7681687	18-02-88
		AU-B- 641816	30-09-93
		AU-B- 8695791	19-03-91
		JP-A- 63119682	24-05-88
		US-A- 5128321	07-07-92
		US-A- 5187263	16-02-93
WO-A-9001550	22-02-90	AU-A- 4036389	05-03-90
		EP-A- 0426744	15-05-91
		JP-T- 4500004	09-01-92
WO-A-9008163	26-07-90	DE-A- 3900770	26-07-90
		AU-A- 4836790	13-08-90
		EP-A- 0453456	30-10-91
		JP-T- 4504407	06-08-92
WO-A-9303143	18-02-93	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 5 C12N15/12 C12N15/63 C12N1' /67 C12N15/85 C07K13/00
A61K37/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 5 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 259 632 (ZYMOGENETICS, INC.) 16. März 1988 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 12, Zeile 29 - Zeile 35; Ansprüche 1-36; Abbildungen 1-8 ---	26-30
X	J. BIOL. CHEM. Bd. 263, Nr. 31, 5. November 1988, AM. SOC. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US; Seiten 16202 - 16208 A. OSTMAN ET AL. 'Synthesis and assembly of a functionally active recombinant platelet-derived growth factor AB heterodimer' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 16205, rechte Spalte, Zeile 12 - Seite 16207, rechte Spalte, Zeile 17; Abbildung 1 --- -/--	26-28

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. November 1993

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06 -01- 1994

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>BIOCHEMISTRY Bd. 29, Nr. 1 , 9. Januar 1990 , AM. CHEM. SOC., WASHINGTON, DC, US; Seiten 166 - 172 C.E. HART ET AL. 'Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 168, rechte Spalte, Zeile 20 - Seite 169, linke Spalte, Zeile 22 siehe Seite 169, linke Spalte, Zeile 23 - rechte Spalte, Zeile 8; Abbildung 1 ---</p>	26-28
Y	<p>WO,A,90 01550 (ZYMOGENETICS, INC.) 22. Februar 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 7, Zeile 15 - Seite 8, Zeile 10; Ansprüche 1-15 ---</p>	1-6
Y	<p>MOL. CELL. BIOL. Bd. 11, Nr. 5 , Mai 1991 , AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, D.C. US; Seiten 2656 - 2664 D. FALCONE AND D.W. ANDREWS 'Both the 5' untranslated region and the sequences surrounding the start site contribute to efficient initiation of translation in vitro' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2662, linke Spalte, Absatz 2 - Seite 2663, linke Spalte, Absatz 3; Abbildung 2 ---</p>	1-6
A	<p>WO,A,90 08163 (HOPPE, J.) 26. Juli 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 13, Zeile 1 - Seite 14, Zeile 11; Ansprüche 1-14 ---</p>	26-30
A	<p>J. BIOL. CHEM. Bd. 263, Nr. 31 , 5. November 1988 , AM. SOC. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US; Seiten 16493 - 16498 A. HAMMACHER ET AL. 'A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain' in der Anmeldung erwähnt insgesamt --- -/--</p>	26-30

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCE Bd. 15, Nr. 12 , Dezember 1990 , ELSEVIER SCIENCE, AMSTERDAM, NL; Seiten 477 - 483 R.J. JACKSON ET AL. 'The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation' in der Anmeldung erwähnt insgesamt</p> <p>---</p>	1-3
A	<p>NUCL. ACID RES. Bd. 19, Nr. 16 , 25. August 1991 , IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; Seiten 4485 - 4490 R.J. KAUFMAN ET AL. 'Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus' in der Anmeldung erwähnt insgesamt</p> <p>---</p>	1-3
P,Y	<p>WO,A,93 03143 (ANDERSON, W., MORGAN, R.A., COUTURE, L.) 18. Februar 1993 siehe Seite 5, Zeile 16 - Seite 9, Zeile 17</p> <p>-----</p>	1-6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inter. Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/02294

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0259632	16-03-88	US-A- 4766073	23-08-88
		US-A- 4849407	18-07-89
		US-A- 4845075	04-07-89
		US-A- 4889919	26-12-89
		AU-A- 7681687	18-02-88
		AU-B- 641816	30-09-93
		AU-B- 8695791	19-03-91
		JP-A- 63119682	24-05-88
		US-A- 5128321	07-07-92
		US-A- 5187263	16-02-93
WO-A-9001550	22-02-90	AU-A- 4036389	05-03-90
		EP-A- 0426744	15-05-91
		JP-T- 4500004	09-01-92
WO-A-9008163	26-07-90	DE-A- 3900770	26-07-90
		AU-A- 4836790	13-08-90
		EP-A- 0453456	30-10-91
		JP-T- 4504407	06-08-92
WO-A-9303143	18-02-93	KEINE	